

11.11.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/6275

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年11月13日

REC'D	06 JAN 2000
WIPO	PCT

出願番号
Application Number:

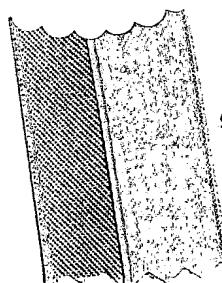
平成10年特許願第323199号

出願人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

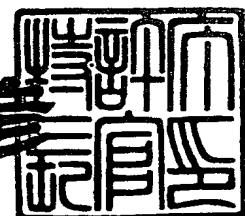
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月17日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特平11-3087614

【書類名】 特許願
 【整理番号】 A98221
 【提出日】 平成10年11月13日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C07K 13/00
 C12N 15/12
 A61K 48/00
 C12D 1/00
 【発明の名称】 新規蛋白質およびその用途
 【請求項の数】 18
 【発明者】
 【住所又は居所】 徳島県徳島市上八万町西山1325番地
 【氏名】 杉野 弘
 【特許出願人】
 【識別番号】 000002934
 【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社
 【代表者】 武田 國男
 【代理人】
 【識別番号】 100073955
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100110456
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 内山 務
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 005142
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規蛋白質およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩。

【請求項2】配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩。

【請求項3】請求項1記載の蛋白質の部分ペプチド、請求項2記載の蛋白質の部分ペプチドまたはそれらの塩。

【請求項4】請求項1記載の蛋白質または請求項2記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA。

【請求項5】配列番号：7で表される塩基配列、配列番号：8で表される塩基配列またはそれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する請求項4記載のDNA。

【請求項6】請求項3記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA。

【請求項7】請求項4記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項8】請求項7記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項9】請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質または請求項2記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質またはそれらの塩の製造方法。

【請求項10】請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項11】請求項10記載の抗体に対して、請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する被検液および標識化された請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を競合的に反応させることを特徴とする請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量方法。

【請求項12】請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質の決定方法。

【請求項13】請求項12記載の方法により得られる、請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質またはその塩。

【請求項14】請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、請求項13記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項15】ツー ハイブリッド(two-hybrid)法を用いることを特徴とする請求項12記載の蛋白質の決定方法または請求項14記載のスクリーニング方法。

【請求項16】請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、請求項13記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項17】請求項14記載のスクリーニング方法または請求項16記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載の蛋白質、請求項2記載の蛋白質、請求項3記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、請求項13記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩。

【請求項18】請求項13記載の蛋白質、請求項17記載の化合物またはそれらの塩を含有してなる医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定のアミノ酸配列を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA領域を含有するDNA、該蛋白質の製造方法および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、多数の生理活性物質が単離・同定され、その機能が解明されつつある。そのなかには、種々の臓器あるいは細胞で多様な活性を示すものもあることが知られている。種々の臓器あるいは細胞における多様な生理活性は、通常、該生理活性物質が結合する受容体を介して具現化しているが、その受容体に結合する生理活性物質の組み合わせがすべての臓器・細胞において同一なのか、あるいは各臓器・細胞に特異的なのは、解明されていない例が多い。

生理活性蛋白質の中にはPDZドメインを持つものがあり、そのPDZドメインは比較的最近見いだされた蛋白質結合ドメインモジュールである。そのため、PDZドメインを持つ蛋白質の生体内での分布、機能、制御機構などはまだ多くが不明であるが、その蛋白質結合の機能を介して、細胞膜の裏打ち構造や細胞骨格のネットワーク形成、さらに細胞内表層に発達した細胞内シグナル伝達のネットワーク形成などに重要な役割を担っていると考えられる。神経系においては、神経伝達物質受容体やイオンチャネルなどの複合体形成に係わるなど、シナプス部位の蛋白質クラスターのアセンブリーに欠かせない。また、最近、シナプス可塑性に伴い発現が調節されるPDZ蛋白質が見出され、PDZ蛋白質が受容体の再配置などを通じて可塑性に伴うシナプスの形態変化に係わっている可能性があり、発生段階の神経ネットワークの構築や生体の脳の高次機能にも関与していると考えられる。PDZドメインは既知のペプチド結合ドメインとの共通点もあるが、明らかな特徴的な点も有している。PDZドメインは細菌から高等植物、動物にまで広く保存されたドメインであり、多くの場合、PDZドメインが認識するのは標的蛋白質の最もC末端の短いアミノ酸配列で、これらの標的蛋白質は

膜貫通型受容体やチャネルであることが多い。P D Z ドメインは同一蛋白質中に2から6回程度繰り返された形で見いだされることが多く、また、ほかのドメインモジュールとは異なり、そのいくつかはホモダイマーを形成する。これらは、P D Z ドメインがシナプスなどの細胞表面構造やタイトジャングクションなど、細胞間接着における蛋白質架橋ネットワークやマイクロドメインの形成などに係わるための重要な特徴である。

P D Z ドメインを持つ蛋白質は種々知られており、その一つとしてセリン／スレオニンキナーゼ型受容体として単離されたアクチビン受容体がある。そのリガンドであるアクチビンは、脳下垂体前葉からの卵胞刺激ホルモン（F S H）の分泌を促進する調節因子である。従来、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌調節は、生殖腺で生産されるステロイドホルモンが主であると考えられていたが、アクチビンおよびこれと相反する作用をもつインヒビンの発見により視床下部－脳下垂体－生殖器官系の新しいホルモン分泌調節機構として関心を集めている。アクチビンの生理活性の解析が進むにつれて、この系は、F S H分泌調節以外に血球系や生殖器官の細胞の分化誘導あるいは阻害活性、神経細胞生存維持活性などの多様な生理活性を有することが解ったが、その詳細な機構については未だ解明されていない点が多い。

【0003】

【本発明の解決しようとする課題】

本発明は、特に脳で発現するP D Z ドメインを持つ蛋白質および該蛋白質に対する結合能を有する受容体（例えば、アクチビン受容体）の生理活性の解明、およびアクチビン－アクチビン受容体系の神経系組織での細胞分化阻害および神経栄養因子様活性の詳細な分子機構等を解明する手段として、新規な該蛋白質の単離法ならびに検出法、該新規蛋白質遺伝子を含むD N A、該新規蛋白質遺伝子がコードする蛋白質の製造法、および該D N Aならびに該蛋白質の用途を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、銳意研究を行った結果、配列番号

：1で表されるマウスアクチビンIIA-N受容体蛋白質の細胞内領域をベイト（bait）とした酵母ツーハイブリッド（two-hybrid）法を用い、マウス脳cDNAライブラリーより結合蛋白質の探索を行い、COS7細胞内でもアクチビンIIA-N受容体との結合が確認できるcDNAクローンを得た。さらに、このクローンがコードする遺伝子の全長を含むcDNAクローンを単離し解析したところ、5個のPDZドメインと2個のWWドメインをコードする領域を含む遺伝子であることを見いだした。この遺伝子にコードされる該蛋白質は、複数の蛋白質-蛋白質相互作用ドメインを持つ蛋白質因子であり、そのうちの一つのドメインを介して、1) アクチビン受容体の細胞内領域と結合し、その結果、アクチビンの細胞内への情報伝達を阻害、2) 他のサイトカイン類の受容体の細胞内領域とは結合せず、それらの細胞内情報伝達には影響を及ぼさないことを見いだした。

さらに、本発明者らは、マウスの各種臓器からpoly(A)⁺RNAを抽出し、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4に示すDNAをプローブとして用い、ノーザンハイブリダイゼーション法にて本発明の新規蛋白質の発現を調べたところ、図13に示すように、特に脳でその発現が多く見られることを見いだした。このことから、該新規蛋白質を加えたアクチビン-アクチビン受容体情報伝達系は、脳細胞の増殖・分化の制御を司っていることが示唆され、脳・神経系疾患の診断、治療等への応用できることを見いだした。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩、
- (2) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質またはその塩、
- (3) 第(1)項記載の蛋白質の部分ペプチド、第(2)項記載の蛋白質の部分ペプチドまたはそれらの塩、

- (4) 第(1)項記載の蛋白質または第(2)項記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA、
- (5) 配列番号：7で表される塩基配列、配列番号：8で表される塩基配列またはそれらとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する第(4)項記載のDNA、
- (6) 第(3)項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する組換えDNA、
- (7) 第(4)項記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (8) 第(7)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、
- (9) 第(8)項記載の形質転換体を培養し、第(1)項記載の蛋白質または第(2)項記載の蛋白質を生成・蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質またはそれらの塩の製造方法、
- (10) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、
- (11) 第(10)項記載の抗体に対して、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有する被検液および標識化された第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を競合的に反応させることを特徴とする第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の定量方法、
- (12) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質の決定方法、
- (13) 第(12)項記載の方法により得られる、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と結合する蛋白質またはその塩、
- (14) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(13)項記載の蛋白質またはその塩ある

いはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(15) ツーハイブリッド法を用いることを特徴とする、第(12)項記載の蛋白質の決定方法または第(14)項記載のスクリーニング方法

(16) 第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(13)項記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(17) 第(14)項記載のスクリーニング方法または第(16)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、第(1)項記載の蛋白質、第(2)項記載の蛋白質、第(3)項記載の部分ペプチドまたはそれらの塩と、第(13)項記載の蛋白質またはその塩あるいはアクチビン受容体蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩、

(18) 第(13)項記載の蛋白質、第(17)項記載の化合物またはそれらの塩を含有してなる医薬を提供する。

【0006】

より具体的には、本発明は、

(19) 蛋白質がPDZドメインを有する蛋白質である第(1)項記載の蛋白質または第(2)項記載の蛋白質、

(20) 蛋白質が脳に特異的に発現する蛋白質である第(19)項記載の蛋白質、

(21) 蛋白質がアクチビン受容体に対する結合能を有する蛋白質である第(20)項記載の蛋白質、

(22) 蛋白質が、配列番号：5で表されるアミノ酸配列、配列番号：5で表されるアミノ酸配列中における配列番号：6以外のアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上10個以下）のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5で表されるアミノ酸配列における配列番号：6以外のアミノ酸

配列中に1または2個以上（好ましくは、2個以上10個以下）のアミノ酸配列が付加または挿入されたアミノ酸配列、あるいは配列番号：5で表されるアミノ酸配列における配列番号：6以外のアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上10個以下）のアミノ酸配列が他のアミノ酸と置換されたアミノ酸配列を含有する第（1）項記載の蛋白質およびそれらの塩、

- （23）酵母を用いる第（15）項記載のツーハイブリッド法、
- （24）標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩をアクチビン受容体に接触させた場合と、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩および試験化合物をアクチビン受容体に接触させた場合における、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩のアクチビン受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0007】

（25）標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩を第（13）項記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合と、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩および試験化合物を第（13）項記載の蛋白質またはその塩に接触させた場合における、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩の第（13）項記載の蛋白質またはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩と第（13）項記載の蛋白質またはその塩との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（26）アクチビン受容体を発現した細胞に第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩を導入した場合と、アクチビン受容体を発現した細胞に第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩および試験化合物を導入した場合における、第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩の該細胞内におけるアクチビン受容体に対する結

含量を測定し、比較することを特徴とする第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（27）標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩をアクチビン受容体を発現した細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩および試験化合物をアクチビン受容体を発現した細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩の該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする標識した第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（28）アクチビン受容体を発現した細胞に第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩を導入した場合と、アクチビン受容体を発現した細胞に第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩および試験化合物を導入した場合における、アクチビン受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする第（1）項記載の蛋白質、第（2）項記載の蛋白質またはそれらの塩とアクチビン受容体との結合を阻害または促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（29）第（24）項～第（28）項のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩、および

（30）第（29）項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物に関する。

【0008】

さらに、本発明は、

（31）外来性の第（4）項記載のDNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、

（32）非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第（31）項記載の非ヒト哺乳動物、

(33) げっ歯類動物がマウスである第(32)項記載の非ヒト哺乳動物、

(34) げっ歯類動物がラットである第(32)項記載の非ヒト哺乳動物、および

(34) 外来性の第(4)項記載のDNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明の配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、纖維芽細胞、纖維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例えば、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球など）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン化細胞など〕もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織〔例えば、脳、脳の各部位（例えば、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳など）脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例えば、大腸、小腸など）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など〕または血球系の細胞もしくはその培養細胞株など（特に脳）に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

【0010】

配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質とは、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質とは、例えば、前記の配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同一の生理活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同一の生理活性としては、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能、臓器発現分布の特異性などの質的要素が挙げられる。実質的に同一とは、それらの生理活性が生物学的または生理学的に同質であることを示す。したがって、受容体親和性の強さなどの活性が同等（例えば、約0.1～2.0倍、好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の強弱、蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

例えば、受容体親和性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、例えば、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から30個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から30個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加または挿入されたアミノ酸配列、配列番号：5または配列番号：6で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から30個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、またはそれらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質などのいわゆるムテインも含まれる。

【0011】

本明細書における蛋白質は、ペプチド表記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする、本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（

-COO⁻) であるが、C末端がアミド (-CONH₂) またはエステル (-COR) であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチル、α-ナフチルメチルなどのC₆₋₁₂アリール-C₁₋₂アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の蛋白質には、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えば、OH、COOH、NH₂、SHなどが適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

【0012】

本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであって、本発明の蛋白質が有する生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布の特異性などを有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち100個以上、好ましくは250個以上、さらに好ましくは350個以上、より好ましくは500個以上、最も好ましくは800個以上のアミノ酸配列を有し、受容体親和性、シグナル情報伝達能などを有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が消失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1から20個程度、より好ましくは1から10個程度、さらに好ましくは数個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1から10個程度、より好ましくは数個程度、さらに好ましくは1から5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO⁻）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断されて生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

【0013】

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。また、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属、アルミニウムまたはアンモニウムなど）との塩、有機塩基（例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-二ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシリアミン、ジシクロヘキシリアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなど）との塩なども用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知の方法によっても製造することもできるし、後述する該蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組合せることにより単離精製することができる。

【0014】

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニルヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBr、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBrエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化

を行った後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20°Cから50°Cの範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5から4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

【0015】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、tert-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、tert-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化、（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド

化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl₂-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、HOBT）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

【0016】

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd 黒あるいは Pd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中の接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また、液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃から40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン補足剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基とし

て用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質またはその部分ペプチドのアミド体を得る別 の方法としては、例えば、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質（部分ペプチド）とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質（部分ペプチド）とを製造し、この両蛋白質（部分ペプチド）を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質（部分ペプチド）を得ることができる。この粗蛋白質（部分ペプチド）は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質（部分ペプチド）のアミド体を得ることができる。

蛋白質またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質（部分ペプチド）のアミド体と同様にして、所望の蛋白質（部分ペプチド）のエステル体を得ることができる。

【0017】

本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は

保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①から⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti、ペプチドシンセシス

(Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明および榎原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組合せて本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを単離精製することができる。上記方法で得られる該蛋白質またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0018】

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたもの、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA画分またはmRNA画分を調製したものを用いて、直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Re

action (以下、RT-PCR法と略称する) によって単離することもできる。

本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または②配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質の生理活性、例えば、受容体親和性、シグナル情報伝達能などの活性、臓器発現分布の特異性などを有する蛋白質をコードするDNAであればいずれのものでもよい。

配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19から40 mM、好ましくは約19から20 mMで、温度が約50から70°C、好ましくは約60から65°Cの条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで、温度が約65°Cの場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0019】

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたもの、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、①配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または②配列番号：7または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジエントな条件は前記と同様のものが用いられる。

【0020】

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）をコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分配列をコードする塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって增幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNA、また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたものを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって単離することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラークローニング（Molecular Cloning）2nd（J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutantTM-G（宝

酒造(株)、MutantTM-K(宝酒造(株))などを用いて、Grouped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。

【0021】

クローン化された本発明の蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができます。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモータなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SP01プロモーター、SP02

プロモーター、p_enPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、pH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合には、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0022】

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）などが挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子を含有する形質転換体をチミジンを含まない培地によっても選択することができる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN末端側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフィオスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクターα・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0023】

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（Escherich

hia col i) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクイレックアシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440 (1954)]などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255 (1983)], 207-221 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87 (1984)]などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、サッカロマイセス ピキア パストリス (*Saccharomyces pastorianus*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (in vivo), 13, 213-217

, 1977) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO($dhfr^{-}$ CHO細胞), マウスL細胞, マウスAT-T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0024】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972) やジーン(Gene), 17巻, 107(1982) などに記載の方法に従って行うことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics) 168巻, 111(1979) などに記載の方法に従って行うことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行うことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988) などに記載の方法に従って行うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコール. 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973) に記載の方法に従って行うことができる。

できる。

このようにして、蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0025】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母抽出物、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5から8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15から43℃で約3から24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30から40℃で約6から24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),

77巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地 [Bitter, G. A. ら プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5 から 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20°C から 35°C で約 24 から 72 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0026】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195巻, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 から 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27°C で約 3 から 5 日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 から 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 から 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30°C から 40°C で約 15 から 60 時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、本発明の蛋白質を培養培地中あるいは形質転換体中に生成せしめることができる。

【0027】

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法によ

り行うことができる。

本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100（商品名）などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が產生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えばトリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定す

ることができる。

【0028】

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質は、温血動物に対して投与することにより抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュvantや不完全フロイントアジュvantを投与してもよい。投与は通常2から6週毎に1回づつ、計2から10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2から5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化蛋白質と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature), 256, 495(1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレンギリコール(PEG)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(

脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 1 から 20 : 1 程度であり、PEG (好ましくは PEG 1000 から PEG 6000) が 10 から 80 % 程度の濃度で添加され、20 から 40 °C、好ましくは 30 から 37 °C で 1 から 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗蛋白質抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、蛋白質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗蛋白質モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した該蛋白質を加え、固相に結合した抗蛋白質モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗蛋白質モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1 から 20 %、好ましくは 10 から 20 % の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1 から 10 % の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日本製薬 (株))などを用いることができる。培養温度は、通常 20 から 40 °C、好ましくは約 37 °C である。培養時間は、通常 5 日から 3 週間、好ましくは 1 週間から 2 週間である。培養は、通常 5 % 炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗蛋白質抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0029】

(b) モノクローナル抗体の精製

抗蛋白質モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法 [例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電

気泳動法、イオン交換体（例えば、D E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法]に従って行うことができる。

【0030】

[ポリクローナル抗体の作製]

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（蛋白質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明の蛋白質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニンなどを重量比でハプテン1に対し、約0.1から20、好ましくは約1から5の割合でカップルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2から6週毎に1回づつ、計約3から10回程度行われる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナ

ル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

本発明の蛋白質または部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAとしては、本発明の蛋白質または部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの塩基配列またはその一部の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該蛋白質または部分ペプチドの発現を抑制し得る作用を有するオリゴヌクレオチドまたはその誘導体であれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

【0031】

該DNAまたはmRNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、該DNAまたはmRNAに相補的な塩基配列（すなわち、該DNAまたはmRNAの相補鎖）の全塩基配列または部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAまたはmRNAの相補鎖の全塩基配列のうち、本発明の蛋白質などのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

【0032】

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明の蛋白質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）およびアンチセンスDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法、②組換え型蛋白質の発現系の構築、③two-hybrid法を用いたアッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、⑥遺伝子治療等の薬

物として用いることができる。

特に、two-hybrid法を用いた本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の取得、さらに、本発明の蛋白質とアクチビン受容体または取得した他の受容体を用いた結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的な情報伝達系の促進薬または阻害薬をスクリーニングすることができ、該促進薬または阻害薬を各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができ、以下により具体的に説明する。

【0033】

(1) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法

本発明の蛋白質は、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質と相互作用する結合蛋白質をスクリーニングすることを特徴とする本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定方法を提供する。

具体的には、本発明の結合蛋白質の決定方法は、宿主細胞発現ベクター上に転写因子のDNA結合領域に本発明の蛋白質を融合させたベクターと被験蛋白質と転写活性化領域融合ライブラリーとを該転写因子結合領域をプロモーター上に保持しているレポーター遺伝子を持つ宿主細胞に導入し、2種の蛋白の結合により上昇するレポーター遺伝子の発現量の変化により、該蛋白質と相互作用する蛋白質またはその塩を決定する方法である。

本発明の結合蛋白質決定方法においては、本発明の蛋白質と被験蛋白質との相互作用を特定のレポーター遺伝子の発現に変換することにより検出するtwo-hybrid法を用いることを特徴とする。

本発明の結合蛋白質決定方法の具体的な説明を以下にする。

まず、結合蛋白質決定方法に用いる本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードする塩基配列またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、温血動物(例、ヒトなど)のゲノムDNA、温血動物(例、ヒトなど)

のゲノムDNAライブラリー、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNA、温血動物(例、ヒトなど)の組織・細胞由来のcDNAライブラリーより自体公知の方法により単離されたDNA、合成または半合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどのいずれであってもよい。一方、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものを用いて直接RT-PCR法によって単離することもでき、あるいは、部分的な塩基配列をそれぞれ化学的に合成し、それらを連結させることによって製造することもできる。

【0034】

スクリーニングする被験蛋白質ライブラリーとしては、市販の各種動物の種々臓器由来のcDNAライブラリー(Clontech社製 MATCHMAKER cDNAなど)などが用いられる。

DNA結合領域と被験蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pAS2-1、pGBT9、pKAD-09、pSD09、pEG202、pBTM116などが用いられる。

転写因子の活性化領域と蛋白質の融合蛋白質を発現させるベクターとしては、pGAD424、pACT2、pKT10Gal-VP、pJG4-5、pVP16などが用いられる。

転写因子としては、GAL4、LexA、SRFなどが用いられる。

レポーター遺伝子としては、b-ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)、ヒスチジン遺伝子(HIS3)、ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチル転移酵素遺伝子などが用いられる。

宿主細胞としては、酵母(Saccharomyces cerevisiae)、大腸菌などが用いられ、その中でもCG-1945、Y190、Y187、HF7c、SFY526、L40、EGY48、HIS/L1、62L酵母株などが用いられる。

具体的には、該蛋白質に結合する蛋白質の決定方法は、まず該蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA断片とプラスミド(例えば、pAS2-1)上のDNA結合領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と同じ続き枠に結合したプラ

スミド、およびプラスミド（例えば、pACT2）上の転写因子（例えば、GAL4）の転写活性化領域をコードする塩基配列を含むDNA断片と結合し、融合蛋白質の形で発現されるcDNAライブラリーを、例えば、モレキュラークローニング（Molecular Cloning）2nd（J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って作成することができる。

【0035】

上記の2種のプラスミドを宿主細胞（例えば、サッカロミマイセス セレビシエ Y190）に導入するには、これらで同時に形質転換してもよいし、または一方のプラスミドを先に導入した後に他方を逐次導入してもよく、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），194巻，182-187（1991）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）75巻，1929（1978）などに記載の方法に従って行うことができる。

形質転換体のレポーター遺伝子の発現、レポーター酵素の発色物質、蛍光物質の生成量あるいは発光量等に変換して検出できる。より具体的には、宿主細胞が酵母の場合、レポーター遺伝子の発現（例えば、β-ガラクトシダーゼ活性）は、レプリカプレート法またはフィルター法を、好ましくはフィルター法を用いて青／白の呈色スクリーニングにより検出することができる。

フィルター法で呈色（例えば、青色）したコロニーは、例えば、ア・プラクチカル・アプローチ（A Practical Approach）（Bartel, P. L. et al., Oxford University Press, Oxford；153-179, 1993a）などに記載の方法に従い処理されることにより、ポジティブクローンの單一コロニーを分離することができる。

分離した單一の形質転換体より、例えば、ジーン（Gene），57巻，267（1987）、バイオ・テクニクス（Bio Techniques），14巻，552（1993）などに記載の方法に従い、プラスミドDNAを回収し、そのDNAの塩基配列の決定により、本発明の蛋白質に対する受容体を決定する

ことができる。

また、市販のキット、例えば、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid Systems (Clontech社製)などを使用しても本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を決定することができ、その場合は、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0036】

(2) 本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が明らかになれば、該結合蛋白質の発現部位および該結合蛋白質を介した本発明の蛋白質が有する作用などを明らかにすることができる。これらの知見を基に、本発明の蛋白質をコードするDNAは、該結合蛋白質を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。また、本発明の蛋白質はアクチビン受容体への結合活性を示すことより、アクチビン受容体を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。

例えば、本発明の蛋白質の遺伝子が脳内に特異的に発現することから、該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した神経細胞異常または脳疾患などを発症している患者がいる場合に(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)脳細胞などに本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞における本発明の蛋白質の作用を充分に発揮させることができる。従って、本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明の蛋白質の結合蛋白質を介した疾患の予防・治療剤として使用することができる。

本発明のDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の

形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0037】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレンジコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（商品名）、HC-O-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性があるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ

、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60Kgとして)においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人(60Kgとして)においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60Kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0038】

(3) 本発明の蛋白質とその結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物のスクリーニング方法

本発明の蛋白質またはその塩を用いるか、または組換え型結合蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって本発明の蛋白質と結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。さらに、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入した形質転換体での2種の蛋白質の相互作用によるレポーター遺伝子の発現系(two-hybrid法)を用いることによっても、本発明の蛋白質と結合蛋白質(例えば、アクチビン受容体)との結合を阻害あるいは促進する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、結合蛋白質を介して細胞刺激活性(例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる本発明の蛋白質に対するアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト)などが含まれる。

【0039】

すなわち、本発明は、1) (i) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発

明の蛋白質またはその塩を接触させた場合と（i i）本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうこと、または、2) (i) 本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質(例えば、アクチビン受容体)をコードするDNAを導入した形質転換体と（i i）試験化合物を接触させた場合の該形質転換体との比較を行なうことを特徴とする本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、1) (i) 本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩を接触させた場合と（i i）本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に、本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を接触させた場合における、例えば、本発明の蛋白質の結合蛋白質に対する、該蛋白質またはその塩の結合量、細胞刺激活性などを測定して比較すること、または、2) (i) 本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質(例えば、アクチビン受容体)をコードするDNAを導入した形質転換体と（i i）試験化合物を接触させた該形質転換体における、例えば、呈色度などによるレポーター遺伝子の発現の程度を比較することを特徴とする。

【0040】

より具体的には、本発明は、

- ①標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ②本発明の蛋白質に対する結合蛋白質が膜結合型の蛋白質（例えば、膜貫通型受容体、チャンネル等）の場合、標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本発明の蛋白

質に対する結合蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明の蛋白質またはその塩を、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞内に発現した結合蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明の蛋白質またはその塩および試験化合物を本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞内に発現した結合蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明の蛋白質またはその塩の該結合蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

④本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞と、該宿主細胞を試験化合物に接触させた場合における、該宿主細胞での本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応（例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、FSHの分泌等）を比較することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩と該結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0041】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）としては、該結合蛋白質またはそれらの塩を含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の抽出物が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、遺伝子組換技術を用いて大量発現させた結合蛋白質またはその塩が

適している。

結合蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、例えば、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではなく、例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。該結合蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(*nuclear polyhedrosis virus*; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒト・ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現した結合蛋白質の量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質またはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した結合蛋白質またはその塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質が膜結合蛋白質の場合、それを含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、結合蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

【0042】

結合蛋白質を含有する細胞としては、結合蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Pottier-E1

v e h j e m型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（K i n e l l m a t i c a社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500から3000r p m）で短時間（通常、約1から10分）遠心し、上清をさらに高速（15000から30000r p m）で通常30分から2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した結合蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該結合蛋白質を含有する細胞や膜画分中の結合蛋白質の量は、1細胞当たり 10^2 から 10^8 分子であるのが好ましく、 10^5 から 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど細胞抽出物あるいは膜画分当たりの本発明の蛋白質との結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適當な結合蛋白質画分と、標識した本発明の蛋白質が必要である。該結合蛋白質画分としては、天然型の結合蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型結合蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、本発明の蛋白質に対する同等の結合活性などを示す。

【0043】

標識した本発明の蛋白質としては、標識した本発明の蛋白質、標識した本発明の蛋白質アナログ化合物などが用いられる。例えば [^3H] 、 [^{125}I] 、 [^{14}C] 、 [^{135}S] など標識された本発明の蛋白質などを利用することができる。

具体的には、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まず、該結合蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより結合蛋白質標品を調製する。バッファーには、p H 4から10（望ましくはp H 6から8）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどの本発明の蛋

白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、C H A P S、T w e e n - 8 0 (商品名) (花王一アトラス社製)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる結合蛋白質や本発明の蛋白質の分解を抑える目的でP M S F、ロイペプチソ、E - 6 4 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01から10m1の該結合蛋白質溶液に、一定量(5000から500000c p m)の標識した本発明の蛋白質を添加し、同時に 10^{-4} から 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(N S B)を知るために大過剰の未標識の本発明の蛋白質を加えた反応チューブも用意する。反応は0から50℃、望ましくは4から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B O)から非特異的結合量(N S B)を引いたカウント(B O - N S B)を100%とした時、特異的結合量(B - N S B)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができ、一方、特異的結合量(B - N S B)が例えば150%以上になる試験化合物を結合促進能力のある候補化合物として選択することができる。

【0044】

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物スクリーニングする前記の④の方法を実施するためには、本発明の蛋白質の遺伝子を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質(例えば、アクチビン受容体)の遺伝子を発現せしめるプラスミドとを導入された宿主細胞内での、本発明の蛋白質および本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の相互作用により発現が制御されている遺伝子群の発現、あるいは生理学的反応(例えば、該結合蛋白質がアクチビン受容体の場合、F S Hの分泌等)を公知の方法を用いて測定することができる。具体的には、宿主細胞が酵母の場合、まず、酵母細胞に本発明の蛋白質と転写制御因子のD N A結合領域とを融合させた蛋白

質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクトビン受容体）と転写制御因子の活性化領域とを融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入した形質転換体を前述と同様の方法にて作製する。スクリーニングを行なうにあたっては、この形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の試験化合物を含む寒天培地上で 30°C で 2 から 4 日間培養する。寒天培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地などが用いられる。その後、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性によるコロニーの呈色として検出するために、フィルター法などを用いて検出する。検出は、形質転換体が付着したフィルター上に、Z 緩衝液／X-gal (Clontech 社) で湿らせたワットマン #5 フィルターまたは VWR グレード 410 フィルターを置き、30°C で 30 分から 8 時間保温した後、フィルター上のコロニーの呈色を、試験化合物を含まないコントロールとしての形質転換体との呈色の度合いを比較する。この時、コントロールと比して、より濃い呈色を示すコロニーの培養培地に加えた試験化合物を結合促進能力のある候補化合物として、また、より薄い呈色を示すコロニーの培養培地に加えた試験化合物を結合阻害能力のある候補化合物として選択することができる。また、レポーター遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性として、基質の分解により生成する o-ニトロフェノール量を測定することにより定量することもできる。まず、形質転換体を 10^{-4} から 10^{-10} M の試験化合物を含む液体培地上で 30°C で 8 から 24 時間振盪培養する。液体培地としては、トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損 SD 培地、トリプトファン／ロイシン欠損 SD 培地などが用いられる。好ましくは一夜培養した後、培養液の一部をYPD 培地に植菌し、OD₆₀₀ が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で 3 から 5 時間振盪培養する。その培養液の一部を遠心した残渣の Z 緩衝液／ β -メルカプトエタノール混合物中に o-ニトロフェニルガラクトシド溶液 (Sigma 社) を加え反応させる。反応は、0 から 50°C で、3 分から 24 時間、望ましくは、30°C で、30 分から 15 時間行い、黄色に着色した上清の 420 nm の吸光度 (OD₄₂₀) を測定する。 β -ガラクトシダーゼ活性は、得られた吸光度 (OD₄₂₀) より以下の計算式を用いて、ミラー単位 (Miller unit) として算出する。

【0045】

試験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約10%以上、好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上増加した場合、該試験化合物を本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を促進する能力のある候補化合物として選択することができる。一方、試験化合物を培地に添加することにより、 β -ガラクトシダーゼ活性値が約10%以上、好ましくは約20%以上、より好ましくは約30%以上、最も好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害する能力のある候補化合物として選択することができる。

レポーター遺伝子の発現活性を測定してスクリーニングを行なうには、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、アクチビン受容体）をコードするDNAが必要である。本発明の蛋白質に対する結合蛋白質をコードするDNAとしては、該DNAを含有するDNAまたはそれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAなどが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0046】

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合を阻害あるいは促進する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞、本発明の蛋白質に対する結合蛋白質を含有する細胞の抽出画分、あるいは本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域を融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドと本発明の蛋白質に対する結合蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合させた蛋白質を発現せしめるプラスミドなどを導入した形質転換体を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①形質転換体

本発明の蛋白質と転写制御因子のDNA結合領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとアクチビンIIA-N受容体蛋白質と転写制御因子の活性化領域を融合した蛋白質を発現せしめるプラスミドとを導入し、形質転換した酵母Y190株

②液体培養培地

トリプトファン／ロイシン／ヒスチジン欠損SD培地：酵母窒素源（Difco社）水溶液をオートクレーブで滅菌後、L-イソロイシン、L-バリン、L-アデニンヘミ硫酸塩、L-アルギニン塩酸塩、L-リジン塩酸塩、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-スレオニン、L-チロシン、L-ウラシルよりなるオートクレーブで滅菌し4℃で保存したドロップアウト溶液を加える。さらに、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロース／ストック溶液（Sigma社）を加え、2%になるように調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

YPD培地：Difcoペプトンに酵母抽出物の水溶液をオートクレーブで滅菌後、フィルターで濾過滅菌した40%デキストロースを加え最終濃度を2%に調整し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

③緩衝液

Z緩衝液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、KCl、MgSO₄・7H₂Oを含み、pHを7付近に調整後、オートクレーブで滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

Z緩衝液／β-メルカプトエタノール：Z緩衝液100に対してβ-メルカプトエタノールを0.27の割合で加えたもの。

④β-ガラクトシダーゼの基質

o-ニトロフェニルガラクトシド溶液（Sigma社）をZ緩衝液に溶解し、4mg/mlの濃度に調整したもので用時調製する。

⑤反応停止液

4℃で保存した1M炭酸ナトリウム溶液を用いるか、あるいは用時調製して

もよい。

【0047】

2. 測定法

- ① 10^{-3} から 10^{-10} Mの試験化合物溶液を $5\mu l$ 加えた 1 ml のトリプトファン／ロイシン欠損 S D 培地で酵母形質転換体を 30°C で一夜振盪培養する。
- ② 培養液 0.4 ml を 1.6 ml の Y P D 培地中に加え、 OD_{600} が 0.5 から 1.0 となるように 30°C で 3 から 5 時間振盪培養する。
- ③ 0.3 ml の培養液を 14000 rpm で 30 秒間遠心し、 残渣を 0.3 ml の Z 緩衝液に懸濁し、 再度遠心後、 沈殿を 0.1 ml の Z 緩衝液に懸濁する。
- ④ 液体窒素にて一旦凍結後、 37°C で 30 秒から 1 分間かけて溶解する。 0.7 ml の Z 緩衝液／ β -メルカプトエタノール混液と 0.16 ml の o-ニトロフェニルガラクトシド溶液を加え、 30°C で溶液が黄色になるまで保温し、 この後 0.4 ml の 1 M 炭酸ナトリウム溶液を加える。
- ⑤ 14000 rpm で 10 分間遠心し、 その上清の 420 nm における吸光度を測定し、 β -ガラクトシダーゼ活性をミラー単位 (Miller unit) として次の式 [数1] で求める。

【0048】

[数1]

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (\text{t} \times \text{V} \times \text{OD}_{600})$$

OD₄₂₀ : 420 nm における吸光度

t : 反応時間 (分)

V : 反応に用いた、 形質転換体の Z 緩衝液の懸濁液量 × 希釀倍率

【0049】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、 本発明の蛋白質（なかでも P D Z ドメインを有し、 特に脳で発現する蛋白質）と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、 アクチビン受容体）との結合を阻害する化合物または促進する化合物（以下、 促進化合物）である。

本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質（例えば、 アクチビン受

容体）との結合を阻害する化合物には、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白に結合することによって、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害し、それ自体が結合蛋白質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるアゴニスト）、②本発明の蛋白質に対する結合蛋白に結合することによって、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害するが、それ自体は結合蛋白質を介した細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆるアンタゴニスト）、③本発明の蛋白質に対する結合蛋白に結合することなく、本発明の蛋白質と本発明の蛋白質に対する結合蛋白との結合を阻害する化合物（以下、阻害化合物と略記）またはその塩などが含まれる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩と本発明の蛋白質に対する結合蛋白質との結合性の有無は、上記した結合活性の測定法に従って確認することができる。

結合蛋白質を介した細胞刺激活性は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0050】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該アゴニストおよび促進化合物は、本発明の蛋白質が有する生理活性と同様の作用を有するか、あるいはその生理活性を増強する作用を有しているので、該蛋白質活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物、特に該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防治療薬として有用である。

逆に、該アンタゴニストまたは阻害化合物は、本発明の蛋白質が有する生理活性を抑制することができるので、該蛋白質活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物、特に該結合蛋白質またはアクチビン受容体に関連した神経細胞異常または脳疾患の予防治療薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って

実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくは、それ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適當な容量が得られるようにするものである。

【0051】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターク、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリソのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレンジリコール、ポリエチレンジリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80(TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンジリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジ

ルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60Kgとして)においては、通常、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60Kgとして)においては、通常、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。ヒト以外の動物の場合も、60Kg当たりに換算した時に同等となるような量を投与することができる。

【0052】

(4) 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の蛋白質抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の蛋白質等に反応する抗体と、被検液および標識化された本発明の蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明の蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法において、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部あるいはC端部を認識する抗体で、他方の抗体が配列番号：5または配列番号：6のアミノ酸配列に反応する抗体であることを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

本発明の蛋白質等を認識するモノクローナル抗体（以下、抗蛋白質抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')、 Fab' あるいは Fab 画分を用いてもよい。$

本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質等の測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば本発明の蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0053】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフェオヌクターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した抗蛋白質抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した抗蛋白質抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化

担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に併行してもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては1次反応と2次反応に用いられる抗蛋白質抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質等のC端部あるいはN端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくは配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を認識する抗体が用いられる。

【0054】

本発明の蛋白質等に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0055】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる〔例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）「Method s in Enzymology」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Selected Immunoassays (Part D)))、同書Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods (Part E)))、同書Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies (Part I)))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照〕。

以上のように、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いることによって本発明の蛋白質等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の蛋白質等に対する抗体を用いて本発明の蛋白質等の濃度を

定量することによって、例えば、本発明の蛋白質等が関与する疾病の診断を行うことができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被験体中に存在する本発明の蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各画分中の本発明の蛋白質等の検出、被験細胞内における本発明の蛋白質等の挙動の分析などのために使用することができる。

【0056】

(5) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする遺伝子異常を検出することができるので、例えば、該DNAの突然変異あるいはmRNAの異常蓄積あるいは異常減少などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年）などにより実施することができる。

【0057】

(6) アンチセンスDNAを含有するDNA

本発明の蛋白質等をコードするDNAまたはmRNAに相補的に結合し、該mRNAの転写あるいは翻訳を抑制することができるアンチセンスDNAは、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常発現を抑制することができる。従って、該アンチセンスDNAは、例えば、本発明の蛋白質等をコードする遺伝子の異常

発現に起因する疾病の予防・治療剤として使用することができる。

該アンチセンスDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様にして製造することができる。例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従ってヒトまたは温血動物に投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのまで、あるいは摂食促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子鏡やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0058】

(7) DNA転移動物の作製

本発明は、外来性の本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (i) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (ii) 非ヒト哺乳動物がげっ歯類動物である第(i)記載の非ヒト哺乳動物、
- (iii) げっ歯類動物がマウスである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、
- (iv) げっ歯類動物がラットである第(ii)記載の非ヒト哺乳動物、および
- (v) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法

、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

【0059】

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ラット、マウス、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なげつ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C 5 7 B L / 6 系統、D B A 2 系統など、交雑系として、B 6 C 3 F ₁ 系統、B D F ₁ 系統、B 6 D 2 F ₁ 系統、B A L B / c 系統、I C R 系統など）またはラット（例えば、W i s t e r, S D など）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明の蛋白質をコードするDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明の蛋白質を発現させる遺伝子を含有するDNAを意味し、例えば、正常な本発明の蛋白質の機能を抑制する蛋白質を発現させる遺伝子を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明の蛋白質をコードするDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例え

ば、本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のDNAを結合したDNAコンストラクト（例えば、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0060】

該コンストラクトを保持するベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスマまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記DNA発現調節を行うプロモーターとしては、例えば、ウイルス（例えば、シミアヌイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由來のものとしては、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチニーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ、ポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チ

オグロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられるが、好ましくは全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどを用いることができる。

【0061】

上記ベクターは、DNA転写哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明の蛋白質の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、ヒトなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来ゲノムDNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAのすべてあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として、自体公知の方法で取得することができる。また、外来性の異常DNAは、本発明の蛋白質の変異を起因とする疾病を発症した上記の細胞または組織より得ることができる。また、上記の細胞または組織より得られた正常な蛋白質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転写動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明のDNAを有する。

【0062】

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配によりDNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するよう繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明の蛋白質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能亢進症や、本発明の蛋白質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外

性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。さらに、目的とする外来性DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の異常DNAを有することを意味する。DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0063】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明の蛋白質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行うことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症における本発明の異常蛋白質による正常蛋白質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、本発明の蛋白質の増加症状を有することから、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えれば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移哺乳動物の組織中のmRNAを直接分析するか、発現した

- ・ 蛋白質組織を分析することによる、本発明の蛋白質により特異的に発現あるいは活性化する蛋白質との関連性についての解析、
- ③上記①記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるあるいは抑制するような薬剤のスクリーニング、および
- ④本発明の変異蛋白質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明の蛋白質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行うことが可能である。さらに、本発明の蛋白質産生細胞の特定化、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができる、本発明の蛋白質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明の蛋白質の機能不活性型不応症を含む、本発明の蛋白質に関連する疾患の治療薬の開発を行うために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明の蛋白質が関連する疾患の遺伝子治療法を検討、開発することが可能である。

【0064】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

c D N A	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
R N A	: リボ核酸
m R N A	: メッセンジャー・リボ核酸
d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
A T P	: アデノシン三リン酸
E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
E I A	: エンザイムイムノアッセイ
G l y	: グリシン
A l a	: アラニン
V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン

P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l	: ピログルタミン酸
M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0065】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

T o s	: p-トルエンスルホニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
C l ₂ B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B o c	: t-ブロキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェノール
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブロキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

HOOBt : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
1, 2, 3-ベンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボジ
イミド

DCC : N, N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0066】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

two-hybrid法に用いる bait プラスミドとしてのアクチビンIIA-N受容体蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントの塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ノーザンハイブリダイゼーションに用いるプローブとしてのDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

本発明の蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：6〕

本発明の蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

本発明の配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

本発明の配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするc

DNAの塩基配列を示す。

【0067】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、酵母を用いたtwo-hybrid法の操作法は市販のキット(Clontech社製)に添付の説明書に記載されている方法に、また、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(molecular cloning)に記載されている方法に従った。

【0068】

【実施例1】本発明の蛋白質をコードするcDNAのクローニング

(1) two-hybrid法によるアクチビンIIA-N受容体蛋白質と相互作用する蛋白質のスクリーニング

以下の、cDNAライブラリーからアクチビンIIA-N受容体蛋白質と相互作用する蛋白質のスクリーニングには、キットとしてMATCHMAKERTM Two-Hybrid System 2 (Cat. No. K1604-1: Clontech社)を用いた。

上記方法に従い、DNA結合用ベクターpAS2-1のEcoRI部位とBamHI部位を適切な制限酵素で切断し、アルカリフォスファターゼ処理した後精製した。その後、配列番号：1で表されるアクチビンIIA-N受容体蛋白質の細胞内ドメインをコードするDNAフラグメントをライゲーションし、目的とするGAL4 DNA結合ドメインとアクチビンIIA-N受容体細胞内ドメイン全体を融合蛋白質として発現するプラスミド(pAS-IIA-N)を得た。GAL4転写活性化領域融合ライブラリープラスミドとしては、市販のマウス脳MATCHMAKER cDNA library(Clontech社)を用いた。

酵母菌株Y190の單一コロニー(直径2から3mm)を20mlのトリプトファン欠損SD培地に植菌し、18時間30℃で振盪培養した。この培養液の10mlを300mlのYPD培地にOD₆₀₀=0.2から0.3なるように植え、30℃で3時間振盪培養した。培養液を滅菌した遠心管に移し、1000×gで5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を25mlの滅菌水に懸濁し、再度

、 $1000 \times g$ で5分間室温で遠心した。上清を捨て、細胞を1.5mlのTE緩衝液(0.01M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)/0.1M酢酸リチウム溶液(pH 7.5)の混合液に懸濁して次の形質転換に用いた。

先に作製した $10 \mu g$ のプラスミド(pAS-IIA-N)と2mgのニシン精巣キャリアーDNA(Clontech社)に上記で作製した細胞懸濁液1mlを加え、よく混合した。さらに、6mlのPEG(40%PEG 4000)/TE緩衝液/0.1M酢酸リチウム溶液の混合液を加え、ボルテックスミキサーで混合した。30℃、200rpmで30分間振盪後、 $700 \mu l$ のDMSO(最終濃度10%)を加えて穏やかに攪拌した。その後、時々振りながら、42℃で15分間加熱し、容器を氷冷後、 $1000 \times g$ で5分間遠心した。上清を捨て、細胞を0.5mlのTE緩衝液に懸濁した。得られた細胞懸濁液 $100 \mu l$ をトリプトファン欠損SD培地上にスプレッドし、30℃で4日間培養し、前記プラスミドを安定に保持する株を得た。続いて、GAL4転写活性化領域融合ライブラリープラスミドも同様の方法にて前記酵母株に導入した。得られた形質転換体0.2mlをトリプトファン/ロイシン/ヒスチジン欠損SD培地上にまき、30℃で8日間培養した後、 His^+ コロニーをトリプトファン/ロイシン/ヒスチジン欠損寒天プレート上にストリークした。

【0069】

シャーレに5mlのZ緩衝液($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7)/X-gal溶液(5-ブロモ-4-クロロ-3インドリル- β -D-ガラクトシドの2%DMF溶液)/ β -メルカプトエタノール混合液を入れ、滅菌したワットマン#5フィルターを湿らせた。別のフィルターを前記形質転換体コロニーがある寒天プレート上に置いた後、このフィルターを取り上げ、コロニー面を上にして液体窒素で凍結させた。液体窒素中からフィルターを取り出し、室温で融解した後、先の湿らせたフィルター上にコロニー面を上にして置いた。シャーレの蓋を閉めて30℃で1時間保温し、青くなった約100個のポジティブコロニーを分離した。得られたそれぞれのポジティブクローンを3mlのロイシン欠損SD液体培地に植え、2日間培養し

た後、この培養液を10000倍に希釈し、ロイシン欠損SDプレートにまき、30℃で3日間保温した。20から30個のコロニーを滅菌した楊枝で拾い、トリプトファン／ロイシン欠損SDプレートとロイシン欠損SDプレートにレプリカした。ここで、先のポジティブコロニーよりトリプトファン栄養要求性を示すコロニーを選択し、そのβ-ガラクトシダーゼ活性の検定を行い、さらに活性を示さない2個のコロニーを選択した。

得られた真のポジティブコロニーを2mlのYPD液体培地に植え、30℃で一夜培養した。培養液を5秒間室温で遠心し、上清を捨てた後、0.2mlの酵母溶解液(2%トリトンX-100, 1%SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA)を加え、懸濁させた。0.2mlのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール(25:24:1)と酸で洗ったガラスビーズを加え、2分間ボルテックスミキサーで攪拌した。14000rpmで5分間室温で遠心した後、分離した上清に1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)と2.5倍量のエタノールを加えた。得られた沈殿物を70%エタノールで洗浄した後、20μlの滅菌水に溶解した。このうちの1μlを大腸菌HB101株にエレクトロポレーション法により導入した後、通常のミニプレップ法でプラスミドDNAを精製し、目的とするcDNA(YN3)を得た。

さらに、YN3の塩基配列の全コード領域を含む完全長cDNAを得るために、得られたYN3のインサート全長を、ランダムプライム法により³²Pで標識した。この標識されたYN3をプローブとして用い、マウス脳 Lambda cDNA library(Lambda ZAPIIベクター: Stratagene社)を通常のブラークハイブリダイゼーションでスクリーニングした。得られたクローンのインサート全長をさらにプローブとして用い、同様のスクリーニングを繰り返し、本発明の蛋白質の全コード領域を含む最長のインサート全長を持つと考えられるものを得た。得られた陽性ファージの一つを、Stratagen社の方法に従い、ファージミド((pBluescript SK)(-)ベクター)に変換し、その塩基配列を決定した。本発明の蛋白質の全長cDNA(YN3-6)は5156bpで、配列番号:5で表される1161個のアミノ酸

からなるポリペプチド【図1～図6】または配列番号：6で表される1112個のアミノ酸からなるポリペプチド【図7および図12】をコードしていた。

配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸からなるポリペプチドをコードする全長cDNA(YN3-6)を含むプラスミドpBSYN3-6を大腸菌DH5 α に形質転換し、形質転換体：大腸菌DH5 α /pBSYN3-6を得た。

【0070】

【実施例2】マウスの各種臓器由来poly(A)⁺RNAを用いたノーザンハイブリダイゼーション法による発現の検出

YN3-6のインサート内の、配列番号：2、配列番号：3および配列番号：4で表されるDNA断片を、DIG-PCRプローブ合成キット(Boehringer社)を用いジゴキシゲニンで標識し、プローブとして用いた。

また、Balb/cマウスより脳、肝臓、脾臓、胚、腎臓、心臓、精巣、卵巣、骨格筋を摘出し、TRIZOL試薬(GIBCO BRL社)によりtota l RNAを抽出した。その後、PolyAT tract mRNA Isolation System(Promega社)を用いて、poly(A)⁺RNAを精製した。

各poly(A)⁺RNAを1 μ gづつ用い、ホルマリンゲル法により1%アガロースゲル電気泳動を行い、ブロッティング装置(Amersham-Pharmacia社)を用いたバキュームブロッティング法により、Hybond N(Amersham-Pharmacia社)にプロットした。これを先に作製したプローブDNAの各5ng/mlを含むハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC, 0.1%N-lauroylsarcosine, 0.02%SDS, 0.5%blocking reagent(Boehringer社), 100 μ g/mlサケ精巣DNA)にて、65℃で一夜保温した。その後、0.1×SSCおよび0.1%SDSを用い、65℃、20分で3回洗浄した。さらに、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer社)を含む溶液(0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 150mU/ml抗体)中で保持した後、0.1M Tris-HCl(p

H 7.5)、0.15M NaClおよび0.1%Twee n 20を用い、15分で3回洗浄した。最後に、Lumi-Phos 530(和光純薬工業社製)を基質とした化学発光を行い、X線フィルムに露光して検出した結果、本発明の蛋白質が特に脳で多く発現していることが確認された【図13】。

【0071】

【発明の効果】

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、本発明の蛋白質と略記する場合がある)、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)、本発明の蛋白質に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)およびアンチセンスDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定、②抗体および血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④発現系を用いた結合アッセイ系およびtwo-hybrid法を用いたアッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、⑦遺伝子治療等の薬物として用いることができる。特に、本発明の蛋白質の構造・性質の解明は、これらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0072】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1466

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

AGACATCACA AGATGGCCTA CCCTCCTGTA CTTGTTCCCTA CTCAACACGC CTTTCATATA	60
ATGATAGAGG ACCCAGGACC ACCCCCCACCT TCCCCATTAC TAGGGTTGAA GCCATTGCAG	120

CTGTTAGAAG	TGAAAGCAAG	GGGAAGATT	GGTGTGTCT	GGAAAGCCCA	GTTGCTCAAT	180
GAATATGTGG	CTGTCAAAAT	ATTCACAATA	CAGGACAAAC	AGTCCTGGCA	GAATGAATAT	240
GAAGTCTATA	GTCTACCTGG	AATGAAGCAT	GAGAACATAC	TACAGTTCAT	TGGTGCAGAG	300
AAAAGAGGCA	CCAGTGTGGA	TGTGGACCTG	TGGCTAATCA	CAGCATTCA	TGAAAGGGC	360
TCACTGTCAG	ACTTCTTAA	GGCTAATGTG	GTCTCTTGGA	ATGAACTTG	TCATATTGCA	420
GAAACCATGG	CTAGAGGATT	GGCATATTCA	CATGAGGATA	TACCTGGCTT	AAAAGATGGC	480
CACAAGCCTG	CAATCTCTCA	CAGGGACATC	AAAAGTAAAAA	ATGTGCTGTT	GAAAAACAAT	540
CTGACAGCTT	GCATTGCTGA	CTTGCGGTG	GCCTTAAAGT	TCGAGGCTGG	CAAGTCTGCA	600
GGTGACACCC	ATGGGCAGGT	TGGTACCCGG	AGGTATATGG	CTCCAGAGGT	GTTGGAGGGT	660
GCTATAAACT	TCCAAAGGGGA	CGCATTCTG	AGGATAGATA	TGTACGCCAT	GGGATTAGTC	720
CTATGGGAAT	TGGCTTCTCG	TTGCAC TGCT	GCAGATGGAC	CCGTAGATGA	GTACATGTTA	780
CCATTTGAGG	AAGAAATTGG	CCAGCATCCA	TCTCTTGAAG	ATATGCAGGA	AGTTGTTGTG	840
CATAAAAAAA	AGAGGCCTGT	TTTAAGAGAT	TATTGGCAGA	AACATGCAGG	AATGGCAATG	900
CTCTGTGAAA	CGATAGAAGA	ATGTTGGAT	CATGATGCAG	AAGCCAGGTT	ATCAGCTGGA	960
TGTGTAGGTG	AAAGAATTAC	TCAGATGCAA	AGACTAACAA	ATATCATTAC	TACAGAGGAC	1020
ATTGTAACAG	TGGTCACAAT	GGTGACAAAT	GTTGACTTTC	CTCCCAAAGA	ATCTAGTCTA	1080
TGATGGTGGC	ACCGTCTGTA	CACACTGAGG	ACTGGGACTC	TGAAC TGGAG	CTGCTAAGCT	1140
AAGGAAAGTG	CTTAGTTGAT	TTTCTGTGTG	AAATGAGTAG	GATGCCTCCA	GGACATGTAC	1200
GCAAGCAGCC	CCTTGTGGAA	AGCATGGATC	TGGGAGATGG	ATCTGGAAA	CTTACTGCAT	1260
CGTCTGCAGC	ACAGATATGA	AGAGGAGTCT	AAGGGAAAAG	CTGCAA ACTG	TAAAGAACTT	1320
CTGAAAATGT	ACTCGAAGAA	TGTGGCCCTC	TCCAAATCAA	GGATCTTTG	GACCTGGCTA	1380
ATCAAGTATT	TGCAAAACTG	ACATCAGATT	TCTTAATGTC	TGTCAGAAGA	CACTAATTCC	1440
TTAAATGAAC	TACTGCTATT	TTTTTT				1466

【0073】

配列番号：2

配列の長さ：1391

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類： c D N A

配列：

TCGCGGCCAC GACCGGCCA GCACCTCCGA GCGACTGACC GACCTCCACG CGCGTCCCGA	60
ACACACTGCC ACCGCCGCCG CCGCCGCCG CGCTCGCGCC GCACTCCCTC GCACGTCAACC	120
ACGTGCCTG CCGCCAACGC CTCCCGGCCG CTTCCGGCTC TGATGCCTGA GCGAATCACA	180
GGCGAGCTCC CGGGAAAGATC CCGCTCTGAG GCTCCGCCCG CGGACAGGGC CCCGCCACC	240
TCATAGCTCT TTTCTCAGC CGCCCCCTCC TTCCTTCTCG GCTCAACTAG GTCAGCGCAA	300
GGTGATCCCG GAGAGCGGGG CGGCGGGGAC CGCTCCTCCT GTTACTTATC GAGCGCGCG	360
TCCCTCCGA GCCTCACACC CTCGCTTCGC CCTTTTTTT CCACTGTCCA GGAAGTGGTT	420
CCCTCCTTCC TCTTCCACCT GCCCTACCTT CTCCAGAGAT CCGACGTGGC GATTAGAGTT	480
CTCAGCGTCA CACTGACTTC TAGGCAACTA GCCTAGACTG GAGCTGCGTG TTGTGGAAC	540
CCCGCGGCAG TAGTTGAGCA TCAGGCTCTT ACCTTGGAGG TGGAGGGGTG AGAAGAATAG	600
AGGAAGAAGG GATAAGTCAG AGGAGGGCCT GAACAACTAG CCCCTCTATT GGCGCTGCTT	660
GGGTGAGCAT TCAGTGAGTG TGTTAAAAA AAAAAGGGA GGGAAAACAA AAGACCTCAG	720
GAGCAGTTT GTGTTGCTGT GTCTGGCTTC AAGAAGAAAA TTCTAGACAT TTATGCCGGC	780
AAGACCAAAG CTCAGCTAAG ACTACTCTC CCAAGAAGAT AATTGTATCA GAGGATGGGT	840
TGGATCAGTA CAGGTGGTTT GAGGAGACGC TGACAGAGGA CCATGGAAAG GTGGGAGAGG	900
ACGCGCGGCT CCTGGGCTTC CTCTGAGCTC AGCTCCAGGC ACCACAAGGC CACATAAGGA	960
GGGTGAGGTC CCTGGAGTGG ACTACATTT CATAACCGTT GAGGAGTTA TGGAATTGGA	1020
GAAAAGTGGT GCTCTCCTAG AAAGCGGGAC CTATGAAGAC AACTACTACG GTACCCCGAA	1080
GCCTCCAGCT GAACCAGCAC CATTATTTA TGTAACAGAC CAGATACTTC CGGGAGCTAC	1140
TCCAAGTGCT GAGGGGAAGC GGAAAAGAAA TAAGTCAGTG ACCAACATGG AGAAAGCAAG	1200
TATAGAGCCT CCAGAGGAGG AAGAAGAAGA AAGGCCTGTA GTCAATGGAA ACGGCGTGGT	1260
CATAACCCCA GAATCCAGTG AACATGAAGA CAAAAGTGCA GGTGCCTCAG GGGAGACACC	1320
CTCCCAGCCT TACCCCTGCAC CCGTGTACAG CCAGCCCGAA GAGCTCAAGG ACCAGATGGA	1380
CGATACAAAG C	1391

【0074】

配列番号：3

配列の長さ：1431

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

CAGTTGAAGG	GAACGTTCCCT	CAGCACCAACC	CTCAAAAAGA	GCAACATGGG	CTTTGGGTTT	60
ACCATAATTG	GTGGAGACGA	GCCGGATGAG	TTTCTACAGG	TGAAAAGTGT	GATCCCGGAT	120
GGGCCTGCCG	CACAGGATGG	GAAAATGGAG	ACAGGTGATG	TCATTGTCTA	TATTAATGAA	180
GTTTGTCTCC	TTGGACACAC	TCATGCAGAT	GTTGTCAAAC	TTTCCAGTC	TGTTCCTATT	240
GGTCAGAGTG	TCAACTTGGT	GTTGTGTCGT	GGCTACCCCTT	TGCCCTTTGA	CCCTGAAGAT	300
CCTGCTAACAA	GCATGGTGCC	ACCCCTTGCA	ATAATGGAGA	GGCCACCTCC	GGTGATGGTC	360
AATGGAAGAC	ATAACTATGA	AACATACTTG	GAATACATT	CTCGGACCTC	ACAGTCGGTC	420
CCAGATATTA	CAGACCGGCC	ACCTCATTCT	TTGCACTCCA	TGCCAGCTGA	CGGCCAGCTA	480
GATGGCACGT	ATCCACCACC	CGTCCATGAC	GACAATGTGT	CTATGGCTTC	GTCTGGAGCC	540
ACTCAAGCTG	AACTTATGAC	CTTAACCATT	GTGAAAGGTG	CCCAGGGATT	TGGCTTTACT	600
ATTGCCGACA	GTCCCACGGG	ACAGCGGGTG	AAACAAATCC	TTGACATTCA	GGGATGCCCT	660
GGGCTGTGTG	AAGGAGACCT	CATTGTTGAG	ATCAACCAAC	AGAATGTACA	GAACCTGAGC	720
CATACAGAAG	TAGTGGATAT	ACTTAAGGAC	TGCCCGTTG	GAAGTGAGAC	TTCTTTAAC	780
ATCCATCGAG	GAGGTTCTT	TTCTCCATGG	AAAACCTCAA	AGCCTATGAT	GGACCGATGG	840
GAGAACCAAG	GCAGTCCACA	AAACAAGTTA	TCTGCTCCGG	CCGTCCCCACA	GAACCTGCC	900
TTCCCACCTG	CCCTTCACAG	GAGCTCCTT	CCTGATTCAA	CAGAGGCCTT	TGACCCACGG	960
AAGCCTGACC	CATATGAGCT	CTACGAGAAA	TCGAGAGCCA	TTTATGAAAG	TAGGCAACAA	1020
GTGCCACCCA	GGACCAGTTT	TCGAATGGAT	TCCTCTGGTC	CAGATTATAA	GGAACCTGGAT	1080
GTTCACCTTC	GGAGGGATGGA	GTCTGGATT	GGCTTAGAA	TCCTGGGGG	AGATGAACCT	1140
GGACAGCCTA	TTTGATCGG	AGCCGTCATT	GCCATGGGCT	CAGCTGACAG	AGACGGCCGT	1200
CTACACCCAG	GAGATGAGCT	TGTCTATGTC	GATGGGATCC	CAGTGGCTGG	CAAGACCCAC	1260
CGCTATGTCA	TCGACCTCAT	GCACCACGCG	GCCCCGAATG	GGCAGGTTAA	CCTCACTGTG	1320
AGAAGAAAGG	TGCTATGTGG	AGGGGAGCCC	TGCCCAGAGA	ATGGGAGGAG	TCCAGGCTCT	1380
GTATCAACTC	ACCAACAGCTC	TCCGCGCAGT	GACTATGCCA	CCTACTCCAA	C	1431

【0075】

配列番号：4

配列の長さ：1085

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

ACCATAACTG TGCCCCATAA AATTGGACGA ATCATTGATG GGAGCCCTGC AGATCGCTGT	60
GCCAAACTCA AAGTGGCGA CCGTATCTTA GCAGTCAACG GCCAGTCTAT CATCAACATG	120
CCTCACGCTG ACATTGTGAA GCTCATCAAG GACGCCGGTC TCAGTGTAC CCTTCGCATC	180
ATTCCTCAGG AGGAGCTCAA CAGCCAACA TCAGCACCCA GTTCAGAGAA ACAGAGCCCC	240
ATGGCCCAGC AGCACAGCCC TCTGGCCCAG CAGAGTCCTC TGGCCCAGCC AAGCCCCGCC	300
ACCCCCAACCA GCCCAGTCGC ACAGCCAGCT CCTCCCAAC CTCTCCAGCT GCAAGGACAC	360
GAAAATAGTT ACAGGTCAGA AGTTAAAGCG AGGCAAGATG TGAAGCCAGA CATCCGGCAG	420
CCTCCCTTCA CAGACTACAG GCAGCCCCCG CTGGACTACA GGCAGCCCCC GGGAGGAGAC	480
TACTCACAGC CCCCACCCCTT GGACTACAGG CAGCACTCTC CAGACACCAG GCAGTACCCCT	540
CTGTCAGACT ACAGGCAGCC ACAGGATTTT GATTATTCA CTGTGGACAT GGAGAAAGGA	600
GCCAAAGGAT TTGGATTCA CATTGTGGA GGAAGGAAAT ACAAGATGGA TCTGTATGTG	660
TTGAGATTGG CAGAGGATGG GCCAGCCATA AGGAACGGCA GGATGAGGGT AGGAGATCAG	720
ATCATTGAAA TAAATGGGAA AAGCACACGA GACATGACCC ACGCCAGAGC AATAGAAACTC	780
ATCAAGTCTG GAGGAAGAAG AGTGCAGCTG CTGCTGAAGA GAGGCACGGG GCAGGTCCCG	840
GAGTATGGAA TGGTACCTTC CAGCCTCTCC ATGTGCATGA AAAGTGACAA GCATGGGTCC	900
CCATATTCT ACTTACTGGG CCACCCCTAAA GACACGACGA ACCCCACGCC TGGAGTGCTG	960
CCGCTGCCGC CGCCCCAGGC CTGCCGGAAG TAGGCGTCTC CCTCGAAGAC ATCCTCTCTC	1020
CATTCTCTCC ATCACATCCA GCCCCACCCCT CCGACCCCTTC CCACCAAGATA GGCCAGACC	1080
CAACT	1085

【0076】

配列番号：5

配列の長さ：1161

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly	Asp	Ala	Asp	Arg	Gly	Pro	Trp	Lys	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Ala	Ala	
1					5				10					15		
Pro	Gly	Leu	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Thr	Arg	Pro	His	Lys	
					20				25					30		
Glu	Gly	Glu	Val	Pro	Gly	Val	Asp	Tyr	Ile	Phe	Ile	Thr	Val	Glu	Glu	
					35				40					45		
Phe	Met	Glu	Leu	Glu	Lys	Ser	Gly	Ala	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Thr	Tyr	
					50				55					60		
Glu	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	
					65				70					75		80
Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Gln	Ile	Leu	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	
					85				90					95		
Glu	Gly	Lys	Arg	Lys	Arg	Asn	Lys	Ser	Val	Thr	Asn	Met	Glu	Lys	Ala	
					100				105					110		
Ser	Ile	Glu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Pro	Val	Val	Asn	
					115				120					125		
Gly	Asn	Gly	Val	Val	Ile	Thr	Pro	Glu	Ser	Ser	Glu	His	Glu	Asp	Lys	
					130				135					140		
Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	Glu	Thr	Pro	Ser	Gln	Pro	Tyr	Pro	Ala	Pro	
					145				150					155		160
Val	Tyr	Ser	Gln	Pro	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Gln	Met	Asp	Asp	Thr	Lys	
					165				170					175		
Pro	Thr	Lys	Pro	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	Asp	Asn	
					180				185					190		

Trp Glu Met Ala Tyr Thr Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile Asp His
 195 200 205
 Asn Thr Lys Thr Thr Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Ala
 210 215 220
 Lys Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu
 225 230 235 240
 Lys Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn
 245 250 255
 Arg Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu Glu Ala Lys Arg Lys Leu
 260 265 270
 Gln Gln His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly Ala Lys Pro Leu Gln
 275 280 285
 Ala Pro Gly Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg Asp Ala Ser Gln
 290 295 300
 Leu Lys Gly Thr Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser Asn Met Gly
 305 310 315 320
 Phe Gly Phe Thr Ile Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe Leu Gln
 325 330 335
 Val Lys Ser Val Ile Pro Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys Met
 340 345 350
 Glu Thr Gly Asp Val Ile Val Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly
 355 360 365
 His Thr His Ala Asp Val Val Lys Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly
 370 375 380
 Gln Ser Val Asn Leu Val Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu
 405 410 415
 Arg Pro Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr

420	425	430
Leu Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp		
435	440	445
Arg Pro Pro His Ser Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp		
450	455	460
Gly Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser		
465	470	475
480		
Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly		
485	490	495
Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg		
500	505	510
Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly		
515	520	525
Asp Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His		
530	535	540
Thr Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr		
545	550	555
560		
Ser Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro		
565	570	575
Lys Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser		
580	585	590
Leu Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu		
595	600	605
His Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys		
610	615	620
Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser		
625	630	635
640		
Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly		
645	650	655

Pro Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly
 660 665 670
 Phe Gly Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu
 675 680 685
 Ile Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu
 690 695 700
 His Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly
 705 710 715 720
 Lys Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn
 725 730 735
 Gly Gln Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Glu
 740 745 750
 Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His
 755 760 765
 Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala
 770 775 780
 Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser
 785 790 795 800
 Leu Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe
 805 810 815
 Gly Phe Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr
 820 825 830
 Ile Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala
 835 840 845
 Asp Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn
 850 855 860
 Gly Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile
 865 870 875 880
 Lys Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu

885	890	895
Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met		
900	905	910
Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro		
915	920	925
Ser Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln		
930	935	940
Pro Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys		
945	950	955
Ala Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp		
965	970	975
Tyr Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr		
980	985	990
Ser Gln Pro Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg		
995	1000	1005
Gln Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe		
1010	1015	1020
Thr Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg		
1025	1030	1035
Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu		
1045	1050	1055
Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile		
1060	1065	1070
Ile Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala		
1075	1080	1085
Ile Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Leu Lys		
1090	1095	1100
Arg Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu		
1105	1110	1115
77		出証特平 11-3087614

Ser Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Leu Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro
 1140 1145 1150
 Leu Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys
 1155 1160 1161

【0077】

配列番号：6

配列の長さ：1112

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Met Glu Leu Glu Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Tyr Glu
 5 10 15
 Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Pro Iys Pro Pro Ala Glu Pro Ala Pro Leu
 20 25 30
 Leu Asn Val Thr Asp Gln Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala Glu
 35 40 45
 Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser
 50 55 60
 Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Asn Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Ser Glu His Glu Asp Lys Ser
 85 90 95
 Ala Gly Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln Pro Tyr Pro Ala Pro Val
 100 105 110
 Tyr Ser Gln Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met Asp Asp Thr Lys Pro
 115 120 125

Thr Lys Pro Glu Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu Pro Asp Asn Trp
 130 135 140
 Glu Met Ala Tyr Thr Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile Asp His Asn
 145 150 155 160
 Thr Lys Thr Thr Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Ala Lys
 165 170 175
 Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu Lys
 180 185 190
 Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg
 195 200 205
 Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln
 210 215 220
 Gln His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ala
 225 230 235 240
 Pro Gly Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg Asp Ala Ser Gln Leu
 245 250 255
 Lys Gly Thr Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser Asn Met Gly Phe
 260 265 270
 Gly Phe Thr Ile Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe Leu Gln Val
 275 280 285
 Lys Ser Val Ile Pro Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys Met Glu
 290 295 300
 Thr Gly Asp Val Ile Val Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly His
 305 310 315 320
 Thr His Ala Asp Val Val Lys Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln
 325 330 335
 Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro
 340 345 350
 Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg

355	360	365
Pro Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu		
370	375	380
Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp Arg		
385	390	395
395 400		
Pro Pro His Ser Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp Gly		
405	410	415
415 420		
Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser Ser		
420	425	430
430 435		
Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly Ala		
435	440	445
445 450		
Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg Val		
450	455	460
460 465		
Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp		
465	470	475
475 480		
Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His Thr		
485	490	495
495 500		
Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr Ser		
500	505	510
510 515		
Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro Lys		
515	520	525
525 530		
Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser Leu		
530	535	540
540 545		
Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu His		
545	550	555
555 560		
Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys Pro		
565	570	575
575 580		
Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Arg		
580	585	590

Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro
 595 600 605
 Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe
 610 615 620
 Gly Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile
 625 630 635 640
 Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu His
 645 650 655
 Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly Lys
 660 665 670
 Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn Gly
 675 680 685
 Gln Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Gly Glu Pro
 690 695 700
 Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His Ser
 705 710 715 720
 Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala Ala
 725 730 735
 Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu
 740 745 750
 Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly
 755 760 765
 Phe Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr Ile
 770 775 780
 Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala Asp
 785 790 795 800
 Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn Gly
 805 810 815
 Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile Lys

820	825	830
Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu Leu		
835	840	845
Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met Ala		
850	855	860
Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser		
865	870	875
Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro		
885	890	895
Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala		
900	905	910
Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp Tyr		
915	920	925
Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr Ser		
930	935	940
Gln Pro Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg Gln		
945	950	955
Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe Thr		
965	970	975
Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg Gly		
980	985	990
Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu Asp		
995	1000	1005
Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile		
1010	1015	1020
Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala Ile		
1025	1030	1035
Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Leu Lys Arg		
1045	1050	1055

Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu Ser
 1060 1065 1070
 Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu Leu
 1075 1080 1085
 Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro Leu
 1090 1095 1100
 Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys
 1105 1110 1112

【0078】

配列番号：7

配列の長さ：3483

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

GGAGACGCTG ACAGAGGACC ATGGAAAGGT GGGAGAGGAC GCGCGGCTCC TGGGCTTCCT	60
CTGAGCTCAG CTCCAGGCAC CACAAGGCCA CATAAGGAGG GTGAGGTCCC TGGAGTGGAC	120
TACATTTCA TAACCGTTGA GGAGTTTATG GAATTGGAGA AAAGTGGTGC TCTCCTAGAA	180
AGCGGGACCT ATGAAGACAA CTACTACGGT ACCCCGAAGC CTCCAGCTGA ACCAGCACCA	240
TTATTAAATG TAACAGACCA GATACTTCCG GGAGCTACTC CAAGTGCTGA GGGGAAGCGG	300
AAAAGAAATA AGTCAGTGAC CAACATGGAG AAAGCAAGTA TAGAGCCTCC AGAGGAGGAA	360
GAAGAAGAAA GGCTGTAGT CAATGGAAAC GGCCTGGTCA TAACCCCCAGA ATCCAGTGAA	420
CATGAAGACA AAAGTGCAGG TGCCTCAGGG GAGACACCCCT CCCAGCCTTA CCCTGCACCC	480
GTGTACAGCC AGCCCGAAGA GCTCAAGGAC CAGATGGACG ATACAAAGCC AACAAAGCCT	540
GAGGAGAACG AGGACTCTGA TCCATTGCCT GATAACTGGG AAATGGCCTA CACAGAGAAG	600
GGGGAAGTCT ACTTCATTGA CCATAACACA AAGACAACAT CATGGCTGGA TCCCGCGACTT	660
GCGAAAAAGG CTAAACCTCC AGAAGAGTGC AAAGAAAATG AGCTTCCATA TGGCTGGGAA	720
AAAATCGATG ATCCTATATA TGGCACTTAC TATGTTGACC ACATAAATAG AAGAACACAG	780

TTTGAAAACC	CTGTCCTGGA	AGCAAAAAGG	AAGCTACAGC	AACATAACAT	GCCCCACACA	840
GAACTTGGAG	CAAAGCCCC	GCAGGCCCA	GGTTTCCGAG	AAAAGCCACT	CTTCACCCGG	900
GATGCATCCC	AGTTGAAGGG	AACGTTCCCTC	AGCACCACCC	TCAAAAAGAG	CAACATGGC	960
TTTGGGTTA	CCATAATTGG	TGGAGACGAG	CCGGATGAGT	TTCTACAGGT	GAAAAGTGTG	1020
ATCCCGGATG	GGCCTGCCGC	ACAGGATGGG	AAAATGGAGA	CAGGTGATGT	CATTGTCTAT	1080
ATTAATGAAG	TTTGTGTCT	TGGACACACT	CATGCAGATG	TTGTCAAAC	TTTCCAGTCT	1140
GTTCCATTG	GTCAGAGTGT	CAACTGGTG	TTGTGTCGTG	GCTACCC	TTGAC	1200
CCTGAAGATC	CTGCTAACAG	CATGGTCCA	CCCCTGCAA	TAATGGAGAG	GCCACCTCCG	1260
GTGATGGTCA	ATGGAAGACA	TAACTATGAA	ACATACTTGG	AATACATTTC	TCGGACCTCA	1320
CAGTCGGTCC	CAGATATTAC	AGACCGGCCA	CCTCATTCTT	TGCAC	TCAT G	1380
GGCCAGCTAG	ATGGCACGTA	TCCACCACCC	GTCCATGACG	ACAATGTGTC	TATGGCTTCG	1440
TCTGGAGCCA	CTCAAGCTGA	ACTTATGACC	TTAACCAATTG	TGAAAGGTGC	CCAGGGATT	1500
GGCTTTACTA	TTGCCGACAG	TCCCACGGGA	CAGCGGGTGA	AACAAATCCT	TGACATTCA	1560
GGATGCCCTG	GGCTGTGTGA	AGGAGACCTC	ATTGTTGAGA	TCAACCAACA	GAATGTACAG	1620
AACCTGAGCC	ATACAGAAGT	AGTGGATATA	CTTAAGGACT	GCCCCGTTGG	AAGTGAGACT	1680
TCTTTAATCA	TCCATCGAGG	AGGTTCTTT	TCTCCATGGA	AAACTCCAAA	GCCTATGATG	1740
GACCGATGGG	AGAACCAAGG	CAGTCCACAA	ACAAGTTAT	CTGCTCCGGC	CGTCCCACAG	1800
AACCTGCCCT	TCCCACCTGC	CCTTCACAGG	AGCTCCTTC	CTGATTCAAC	AGAGGCCTT	1860
GACCCACGGA	AGCCTGACCC	ATATGAGCTC	TACGAGAAAT	CGAGAGCCAT	TTATGAAAGT	1920
AGGCAACAAG	TGCCACCCAG	GACCAGTTT	CGAATGGATT	CCTCTGGTCC	AGATTATAAG	1980
GAACGGATG	TTCACCTTCG	GAGGATGGAG	TCTGGATTG	GCTT	TAGAAT CCTTGGGGGA	2040
GATGAACCTG	GACAGCCTAT	TTTGATCGGA	GCCGTCAATTG	CCATGGGCTC	AGCTGACAGA	2100
GACGGCCGTC	TACACCCAGG	AGATGAGCTT	GTCTATGTG	ATGGGATCCC	AGTGGCTGGC	2160
AAGACCCACC	GCTATGTCA	CGACCTCATG	CACCACGCCG	CCCGCAATGG	GCAGGTTAAC	2220
CTCACTGTGA	GAAGAAAGGT	GCTATGTGGA	GGGGAGCCCT	GCCCAGAGAA	TGGGAGGAGT	2280
CCAGGCTCTG	TATCAACTCA	CCACAGCTCT	CCGCGCAGTG	ACTATGCCAC	CTACTCCAAC	2340
AGCAACCACG	CCGCCCCCAG	CAGCAATGCC	TCACCTCCTG	AAGGCTTGC	CTCACACAGC	2400
TTGCAGACCA	GTGATGTGGT	CATTCAACCGC	AAAGAAAACG	AAGGGTTTGG	CTTCGTCA	2460
ATCAGCTCTC	TGAACAGGCC	TGAGTCTGGA	GCCACCATAA	CTGTGCCCA	AAAAATTGGA	2520

CGAATCATTG ATGGGAGCCC TGCAGATCGC TGTGCCAAC TCAAAGTGGG CGACCGTATC	2580
TTAGCAGTCA ACGGCCAGTC TATCATCAC ACATGCCTCACG CTGACATTGT GAAGCTCATC	2640
AAGGACGCCG GTCTCAGTGT CACCCTCGC ATCATTCCCTC AGGAGGAGCT CAACAGCCCA	2700
ACATCAGCAC CCAGTTAGA GAAACAGAGC CCCATGGCCC AGCAGCACAG CCCTCTGGCC	2760
CAGCAGAGTC CTCTGGCCCA GCCAAGCCCC GCCACCCCCA ACAGCCCAGT CGCACAGCCA	2820
GCTCCTCCCC AACCTCTCCA GCTGCAAGGA CACGAAAATA GTTACAGGTC AGAAGTTAAA	2880
GCGAGGCAAG ATGTGAAGCC AGACATCCGG CAGCCTCCCT TCACAGACTA CAGGCAGCCC	2940
CCGCTGGACT ACAGGCAGCC CCCGGGAGGA GACTACTCAC AGCCCCCACC CTTGGACTAC	3000
AGGCAGCACT CTCCAGACAC CAGGCAGTAC CCTCTGTCAG ACTACAGGCA GCCACAGGAT	3060
TTTGATTATT TCACTGTGGA CATGGAGAAA GGAGCCAAAG GATTGGATT CAGCATTG	3120
GGAGGAAGGG AATACAAGAT GGATCTGTAT GTGTTGAGAT TGGCAGAGGA TGGGCCAGCC	3180
ATAAGGAACG GCAGGATGAG GGTAGGAGAT CAGATCATTG AAATAAATGG GGAAAGCACA	3240
CGAGACATGA CCCACGCCAG AGCAATAGAA CTCATCAAGT CTGGAGGAAG AAGAGTGCAG	3300
CTGCTGCTGA AGAGAGGCAC GGGGCAGGTC CCGGAGTATG GAATGGTACC TTCCAGCCTC	3360
TCCATGTGCA TGAAAAGTGA CAAGCATGGG TCCCCATATT TCTACTTACT GGGCCACCCCT	3420
AAAGACACGA CGAACCCCCAC GCCTGGAGTG CTGCCGCTGC CGCCGCCCA GGCTGCCGG	3480
AAG	3483

【0079】

配列番号：8

配列の長さ：3336

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

ATGGAATTGG AGAAAAGTGG TGCTCTCCTA GAAAGCGGGA CCTATGAAGA CAACTACTAC	60
GGTACCCGA AGCCTCCAGC TGAACCAGCA CCATTATTAA ATGTAACAGA CCAGATACTT	120
CCGGGAGCTA CTCCAAGTGC TGAGGGAG CGGAAAAGAA ATAAGTCAGT GACCAACATG	180
GAGAAAGCAA GTATAGAGCC TCCAGAGGAG GAAGAAGAAG AAAGGCCTGT AGTCAATGGA	240

AACGGCGTGG	TCATAACCCC	AGAATCCAGT	GAACATGAAG	ACAAAAGTGC	AGGTGCCTCA	300
GGGGAGACAC	CCTCCCAGCC	TTACCCCTGCA	CCCGTGTACA	GCCAGCCCCGA	AGAGCTCAAG	360
GACCAGATGG	ACGATACAAA	GCCAACAAAG	CCTGAGGAGA	ACGAGGACTC	TGATCCATTG	420
CCTGATAACT	GGGAAATGGC	CTACACAGAG	AAGGGGGAAAG	TCTACTTCAT	TGACCATAAAC	480
ACAAAGACAA	CATCATGGCT	GGATCCCGGA	CTTGCAGAAAA	AGGCTAAACC	TCCAGAAGAG	540
TGCAAAGAAA	ATGAGCTTCC	ATATGGCTGG	GAAAAAAATCG	ATGATCCTAT	ATATGGCACT	600
TACTATGTTG	ACCACATAAA	TAGAAGAACAA	CAGTTTGAAA	ACCCTGTCCT	GGAAGCAAAA	660
AGGAAGCTAC	AGCAACATAA	CATGCCAAC	ACAGAACTTG	GAGCAAAGCC	CCTGCAGGCC	720
CCAGGTTTCC	GAGAAAAGCC	ACTCTTCACC	CGGGATGCAT	CCCAGTTGAA	GGGAACGTTC	780
CTCAGCACCA	CCCTCAAAAAA	GAGCAACATG	GGCTTTGGGT	TTACCATAAT	TGGTGGAGAC	840
GAGCCGGATG	AGTTTCTACA	GGTGAAGAAAGT	GTGATCCCGG	ATGGGCCTGC	CGCACAGGAT	900
GGGAAAATGG	AGACAGGTGA	TGTCATTGTC	TATATTAAATG	AAGTTGTGT	CCTGGACAC	960
ACTCATGCAG	ATGTTGTCAA	ACTTTCCAG	TCTGTTCCCTA	TTGGTCAGAG	TGTCAACTTG	1020
GTGTTGTGTC	GTGGCTACCC	TTTGCCCTTT	GACCCCTGAAG	ATCCTGCTAA	CAGCATGGTG	1080
CCACCCCTTG	CAATAATGGA	GAGGCCACCT	CCGGTGTATGG	TCAATGGAAG	ACATAACTAT	1140
GAAACATACT	TGGAATACAT	TTCTCGGACC	TCACAGTCGG	TCCCAGATAT	TACAGACCGG	1200
CCACCTCATT	CTTGCACTC	CATGCCAGCT	GACGGCCAGC	TAGATGGCAC	GTATCCACCA	1260
CCCGTCCATG	ACGACAATGT	GTCTATGGCT	TCGTCTGGAG	CCACTCAAGC	TGAACATTATG	1320
ACCTTAACCA	TTGTGAAAGG	TGCCCAAGGGA	TTTGGCTTTA	CTATTGCCGA	CAGTCCCACG	1380
GGACAGCGGG	TGAAACAAAT	CCTTGACATT	CAGGGATGCC	CTGGGCTGTG	TGAAGGAGAC	1440
CTCATTGTTG	AGATCAACCA	ACAGAAATGTA	CAGAACCTGA	GCCATACAGA	AGTAGTGGAT	1500
ATACTTAAGG	ACTGCCCGT	TGGAAGTGAG	ACTTCTTTAA	TCATCCATCG	AGGAGGTTTC	1560
TTTTCTCCAT	GGAAAACCTCC	AAAGCCTATG	ATGGACCGAT	GGGAGAACCA	AGGCAGTCCA	1620
CAAACAAGTT	TATCTGCTCC	GGCCGTCCCCA	CAGAACCTGC	CCTTCCCACC	TGCCCTTCAC	1680
AGGAGCTCCT	TTCCCTGATTG	AACAGAGGCC	TTTGACCCAC	GGAAAGCCTGA	CCCATATGAG	1740
CTCTACGAGA	AATCGAGAGC	CATTTATGAA	AGTAGGCAAC	AAGTGCCACC	CAGGACCAGT	1800
TTTCGAATGG	ATTCCCTCTGG	TCCAGATTAT	AAGGAAGTGG	ATGTTCACCT	TCGGAGGATG	1860
GAGTCTGGAT	TTGGCTTAG	AATCCTGGGG	GGAGATGAAC	CTGGACAGCC	TATTTTGATC	1920
GGAGCCGTCA	TTGCCATGGG	CTCAGCTGAC	AGAGACGGCC	GTCTACACCC	AGGAGATGAG	1980

CTTGTCTATG TCGATGGAT CCCAGTGGCT GGCAAGACCC ACCGCTATGT CATCGACCTC	2040
ATGCACCACG CGGCCCGCAA TGGGCAGGTT AACCTCACTG TGAGAAGAAA GGTGCTATGT	2100
GGAGGGGAGC CCTGCCAGA GAATGGGAGG AGTCCAGGCT CTGTATCAAC TCACCACAGC	2160
TCTCCGGCA GTGACTATGC CACCTACTCC AACAGCAACC ACGCCGCCCC CAGCAGCAAT	2220
GCCTCACCTC CTGAAGGCTT TGCCTCACAC AGCTTGCAGA CCAGTGATGT GGTCAATTAC	2280
CGCAAAGAAA ACGAAGGGTT TGGCTTCGTC ATCATCAGCT CTCTGAACAG GCCTGAGTCT	2340
GGAGCCACCA TAACTGTGCC CCATAAAATT GGACGAATCA TTGATGGGA GCCCTGCAGAT	2400
CGCTGTGCCA AACTCAAAGT GGGCGACCGT ATCTTAGCAG TCAACGGCCA GTCTATCATC	2460
AACATGCCTC ACGCTGACAT TGTGAAGCTC ATCAAGGACG CCGGTCTCAG TGTCAACCTT	2520
CGCATCATTC CTCAGGAGGA GCTCAACAGC CCAACATCAG CACCCAGTTC AGAGAACAG	2580
AGCCCCATGG CCCAGCAGCA CAGCCCTCTG GCCCAGCAGA GTCCTCTGGC CCAGCCAAGC	2640
CCCGCCACCC CCAACAGCCC AGTCGCACAG CCAGCTCCTC CCCAACCTCT CCAGCTGCAA	2700
GGACACGAAA ATAGTTACAG GTCAGAAGTT AAAGCGAGGC AAGATGTGAA GCCAGACATC	2760
CGGCAGCCTC CCTTCACAGA CTACAGGCAG CCCCCGCTGG ACTACAGGCA GCCCCCCGGGA	2820
GGAGACTACT CACAGCCCCC ACCCTTGGAC TACAGGCAGC ACTCTCCAGA CACCAGGCAG	2880
TACCCCTCTGT CAGACTACAG GCAGCCACAG GATTTGATT ATTTCACTGT GGACATGGAG	2940
AAAGGAGCCA AAGGATTGG ATTCAAGCATT CGTGGAGGAA GGGAAATACAA GATGGATCTG	3000
TATGTGTTGA GATTGGCAGA GGATGGCCA GCCATAAGGA ACGGCAGGAT GAGGGTAGGA	3060
GATCAGATCA TTGAAATAAA TGGGGAAAGC ACACGAGACA TGACCCACGC CAGAGCAATA	3120
GAACTCATCA AGTCTGGAGG AAGAAGAGTG CGGCTGCTGC TGAAGAGAGG CACGGGGCAG	3180
GTCCCCGGAGT ATGGAATGGT ACCTTCCAGC CTCTCCATGT GCATGAAAG TGACAAGCAT	3240
GGGTCCCCAT ATTTCTACTT ACTGGGCCAC CCTAAAGACA CGACGAACCC CACGCCTGGA	3300
GTGCTGCCGC TGCCGCCGCC CCAGGCCTGC CGGAAG	3336

【0080】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。

【図2】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図1の続きである。

【図3】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図2の続きである。

【図4】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図3の続きである。

【図5】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図4の続きである。

【図6】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：5）を示す。図5の続きである。

【図7】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。

【図8】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図7の続きである。

【図9】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図8の続きである。

【図10】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図9の続きである。

【図11】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図10の続きである。

【図12】本発明の新規蛋白質をコードするcDNAの全塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。図11の続きである。

【図13】ノーザンハイブリダイゼーションによる発現の解析結果を示す。

【書類名】図面

【図1】

TCGGCCCCACGACGCCAGCACCTCCGAGCGACTGACCGACCTCCACGCCGTCCC	60
ACACACTGCCACCGCCGCCCCCGCCGCGCGCTCGCGCCGACTCCCTCGCACGTACC	120
ACGTGCCTGCCGCCAACGCCCTCCGGCCGTTCCGGCTCTGATGCCGTAGCGAATCACA	180
GGCGAGCTCCGGGAAGATCCCCCTTGAGGCTCCGCCCGGACAGGGCCCCGCCACC	240
TCATAGCTTTCTCAGCCGCCCCCTCTTCTTCGGCTCAACTAGGTAGCGCAA	300
GGTGATCCGGAGAGCGGGGGCGCGGGGACCGCTCCTCTGTTACTTATCGAGCGCGC	360
TCCCTCCGAGCCTCACACCCTCGTTGCCCTTTTTCCACTGTCCAGGAAGTGGTT	420
CCCTCCTCCTTCCACCTGCCCTACCTCTCCAGAGATCCGACGTGGCATTAGAGTT	480
CTCAGCGTCACACTGACTTAGGCAACTAGCCTACACTGGAGCTGCGTGTGGAAAC	540
CCCGCGGCACTAGTGAGCATCAGGCTTACCTGGAGGTGGAGGGTGAGAACAAATAG	600
AGGAAGAAGGGATAAGTCAGAGGAGGGCTGAACAACTAGCCCCTATTGGCCTGCTT	660
GCCTGAGCATTCACTGAGTGTGTTAAAAAAAAAGGGAGGGAAAACAAAGACCTCAG	720
GAGCAGTTGTGTTGCTGTGCTGGCTCAAGAAGAAAATTCTAGACATTATGCCGGC	780
AAGACCAAAGCTCAGCTAAGACTACTTCTCCAAGAACATAATTGTATCAGAGGATGGGT	840
TGGATCAGTACAGGTGGTTGA GGA GAC GCT GAC AGA GGA CCA TGG AAA GGT GGG	895
Gly Asp Ala Asp Arg Gly Pro Trp Lys Gly Gly	11
AGA GGA CGC GCG GCT CCT GGG CTT CCT CTG AGC TCA GCT CCA GGC ACC ACA	946
Arg Gly Arg Ala Ala Pro Gly Leu Pro Leu Ser Ser Ala Pro Gly Thr Thr	28
AGG CCA CAT AAG GAG GGT GAG GTC CCT GGA GTG GAC TAC ATT TTC ATA ACC	997
Arg Pro His Lys Glu Gly Glu Val Pro Gly Val Asp Tyr Ile Phe Ile Thr	45
GTT GAG GAG TTT ATG GAA TTG GAG AAA AGT GGT GCT CTC CTA GAA AGC GGG	1048
Val Glu Glu Phe Met Glu Leu Glu Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly	62
ACC TAT GAA GAC AAC TAC TAC GGT ACC CCG AAG CCT CCA GCT GAA CCA GCA	1099
Thr Tyr Glu Asp Asn Tyr Tyr Gly Thr Pro Iys Pro Pro Ala Glu Pro Ala	79
CCA TTA TTA AAT GTA ACA GAC CAG ATA CTT CCG GGA GCT ACT CCA AGT GCT	1150
Pro Leu Leu Asn Val Thr Asp Gln Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala	96
GAG GGG AAG CGG AAA AGA AAT AAG TCA GTG ACC AAC ATG GAG AAA CCA AGT	1201

【図2】

Glu Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser 113
 ATA GAG CCT CCA GAG GAG GAA GAA GAA AGG CCT GTA GTC AAT GGA AAC 1252
 Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly Asn 130
 GGC GTG GTC ATA ACC CCA GAA TCC AGT GAA CAT GAA GAC AAA AGT GCA GGT 1303
 Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Ser Glu His Glu Asp Lys Ser Ala Gly 147
 GCC TCA GGG GAG ACA CCC TCC CAG CCT TAC CCT GCA CCC GTG TAC AGC CAG 1354
 Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln Pro Tyr Pro Ala Pro Val Tyr Ser Gln 164
 CCC GAA GAG CTC AAG GAC CAG ATG GAC GAT ACA AAG CCA ACA AAG CCT GAG 1405
 Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met Asp Asp Thr Lys Pro Thr Lys Pro Glu 181
 GAG AAC GAG GAC TCT GAT CCA TTG CCT GAT AAC TGG GAA ATG GCC TAC ACA 1456
 Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu Pro Asp Asn Trp Glu Met Ala Tyr Thr 198
 GAG AAG GGG GAA GTC TAC TTC ATT GAC CAT AAC ACA AAG ACA ACA TCA TGG 1507
 Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Ser Trp 215
 CTG GAT CCG CGA CTT GCG AAA AAG GCT AAA CCT CCA CAA GAG TGC AAA GAA 1558
 Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Ala Lys Pro Pro Glu Glu Cys Lys Glu 232
 AAT GAG CTT CCA TAT GGC TGG GAA AAA ATC GAT GAT CCT ATA TAT GCC ACT 1609
 Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu Lys Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr 249
 TAC TAT GTT GAC CAC ATA AAT AGA AGA ACA CAG TTT GAA AAC CCT GTC CTG 1660
 Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu 266
 GAA GCA AAA AGG AAG CTA CAG CAA CAT AAC ATG CCC CAC ACA GAA CTT GGA 1711
 Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln Gln His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly 283
 GCA AAG CCC CTG CAG GCC CCA GGT TTC CGA GAA AAG CCA CTC TTC ACC CGG 1762
 Ala Lys Pro Leu Gln Ala Pro Gly Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg 300
 GAT GCA TCC CAG TTG AAG GGA ACG TTC CTC AGC ACC ACC CTC AAA AAG AGC 1813
 Asp Ala Ser Gln Leu Lys Gly Thr Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Lys Ser 317
 AAC ATG GGC TTT GGG TTT ACC ATA ATT GGT GGA GAC GAG CCG GAT GAG TTT 1864
 Asn Met Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe 334
 CTA CAG CTG AAA AGT GTG ATC CCG GAT GGG CCT GCC GCA CAG GAT GGG AAA 1915

【図3】

Leu Gln Val Lys Ser Val Ile Pro Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys 351
 ATG CAG ACA GCT GAT GTC ATT GTC TAT ATT AAT GAA GTT TGT GTC CTT GGA 1966
 Met Glu Thr Gly Asp Val Ile Val Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly 368
 CAC ACT CAT GCA GAT GTC AAA CTT TTC CAG TCT GTT CCT ATT GGT CAG 2017
 His Thr His Ala Asp Val Val Lys Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln 385
 AGT GTC AAC TTG GTG TTG TGT CGT GGC TAC CCT TTG CCC TTT GAC CCT GAA 2068
 Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro Glu 402
 GAT CCT GCT AAC AGC ATG GTG CCA CCC CTT GCA ATA ATG GAG AGG CCA CCT 2119
 Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg Pro Pro 419
 CCG GTG ATG GTC AAT GGA AGA CAT AAC TAT GAA ACA TAC TTG GAA TAC ATT 2170
 Pro Val Met Val Asn Gly Arg His Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu Glu Tyr Ile 436
 TCT CGG ACC TCA CAG TCG GTC CCA GAT ATT ACA GAC CGG CCA CCT CAT TCT 2221
 Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro Asp Ile Thr Asp Arg Pro Pro His Ser 453
 TTG CAC TCC ATG CCA GCT GAC GGC CAG CTA GAT GGC ACG TAT CCA CCA CCC 2272
 Leu his Ser Met Pro Ala Asp Gly Gln Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Pro 470
 GTC CAT GAC GAC AAT GTG TCT ATG GCT TCG TCT GGA GCC ACT CAA GCT GAA 2323
 Val His Asp Asp Asn Val Ser Met Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu 487
 CTT ATG ACC TTA ACC ATT GTG AAA GGT GCC CAG GGA TTT GGC TTT ACT ATT 2374
 Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys Gly Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile 504
 GCC GAC AGT CCC ACG GGA CAG CGG GTG AAA CAA ATC CTT GAC ATT CAG GGA 2425
 Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly 521
 TGC CCT GGG CTG TGT GAA GGA GAC CTC ATT GTT GAG ATC AAC CAA CAG AAT 2476
 Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn 538
 GTA CAG AAC CTG AGC CAT ACA GAA GTA GTG GAT ATA CTT AAG GAC TGC CCC 2527
 Val Gln Asn Leu Ser His Thr Glu Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro 555
 GTT GGA AGT GAG ACT TCT TTA ATC ATC CAT CGA GGA GGT TTC TTT TCT CCA 2578
 Val Gly Ser Glu Thr Ser Leu Ile Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro 572
 TGG AAA ACT CCA AAG CCT ATG ATG GAC CGA TGG GAG AAC CAA GGC AGT CCA 2629

【図4】

Trp Lys Thr Pro Lys Pro Met Met Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro 589
 CAA ACA ACT TTA TCT GCT CCG GCC GTC CCA CAG AAC CTG CCC TTC CCA CCT 2680
 Gln Thr Ser Leu Ser Ala Pro Ala Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro 606
 GCC CTT CAC AGG AGC TCC TTT CCT GAT TCA ACA GAG GCC TTT GAC CCA CGG 2731
 Ala Leu His Arg Ser Ser Phe Pro Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg 623
 AAG CCT GAC CCA TAT GAG CTC TAC GAG AAA TCG AGA GCC ATT TAT GAA AGT 2782
 Lys Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser 640
 AGG CAA CAA GTG CCA CCC AGG ACC AGT TTT CGA ATG GAT TCC TCT GGT CCA 2833
 Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro 657
 GAT TAT AAG GAA CTG GAT GTT CAC CTT CGG AGG ATG GAG TCT GGA TTT GCC 2884
 Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe Gly 674
 TTT AGA ATC CTT GGG GGA GAT GAA CCT CGA CAG CCT ATT TTG ATC GGA GCC 2935
 Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile Gly Ala 691
 GTC ATT GCC ATG GGC TCA GCT GAC AGA GAC GGC CGT CTA CAC CCA GGA GAT 2986
 Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp Arg Asp Gly Arg Leu His Pro Gly Asp 708
 GAG CTT GTC TAT GTC GAT GGG ATC CCA GTG GCT GGC AAG ACC CAC CGC TAT 3037
 Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile Pro Val Ala Gly Lys Thr His Arg Tyr 725
 GTC ATC GAC CTC ATG CAC CAC GCG GCC CGC AAT GGG CAG GTT AAC CTC ACT 3088
 Val Ile Asp Leu Met His His Ala Ala Arg Asn Gly Gln Val Asn Leu Thr 742
 GTG AGA AGA AAG GTG CTA TGT GGA GGG GAG CCC TCC CCA GAG AAT GGG AGG 3139
 Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly Gly Glu Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg 759
 AGT CCA GGC TCT GTA TCA ACT CAC CAC AGC TCT CCG CGC AGT GAC TAT GCC 3190
 Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His His Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala 776
 ACC TAC TCC AAC AGC AAC CAC GCC GCC CCC AGC AGC AAT GCC TCA CCT CCT 3241
 Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro 793
 GAA GGC TTT GCC TCA CAC AGC TTG CAG ACC AGT GAT GTG GTC ATT CAC CGC 3292
 Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg 810
 AAA GAA AAC GAA GGG TTT GGC TTC GTC ATC ATC AGC TCT CTG AAC AGG CCT 3343

【図5】

Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro 827
 GAG TCT GGA GCC ACC ATA ACT GTG CCC CAT AAA ATT GGA CGA ATC ATT GAT 3394
 Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Val Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp 844
 GGG AGC CCT GCA GAT CGC TGT GCC AAA CTC AAA GTG GGC GAC CGT ATC TTA 3445
 Gly Ser Pro Ala Asp Arg Cys Ala Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu 861
 GCA GTC AAC GGC CAG TCT ATC ATC AAC ATG CCT CAC GCT GAC ATT GTG AAG 3496
 Ala Val Asn Gly Gln Ser Ile Ile Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys 878
 CTC ATC AAG GAC GCC GGT CTC AGT GTC ACC CTT CGC ATC ATT CCT CAG GAG 3547
 Leu Ile Lys Asp Ala Gly Leu Ser Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu 895
 GAG CTC AAC AGC CCA ACA TCA GCA CCC AGT TCA GAG AAA CAG AGC CCC ATG 3598
 Glu Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met 912
 GCC CAG CAG CAC AGC CCT CTG GCC CAG CAG AGT CCT CTG GCC CAG CCA AGC 3649
 Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser 929
 CCC GCC ACC CCC AAC AGC CCA GTC GCA CAG CCA GCT CCT CCC CAÁ CCT CTC 3700
 Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro Leu 946
 CAG CTG CAA GGA CAC GAA AAT AGT TAC AGG TCA GAA GTT AAA GCG AGG CAA 3751
 Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala Arg Gln 963
 GAT GTG AAG CCA GAC ATC CGG CAG CCT CCC TTC ACA GAC TAC AGG CAG CCC 3802
 Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln Pro Pro Phe Thr Asp Tyr Arg Gln Pro 980
 CCG CTG GAC TAC AGG CAG CCC CCG GGA GGA GAC TAC TCA CAG CCC CCA CCC 3853
 Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Gly Asp Tyr Ser Gln Pro Pro Pro 997
 TTG GAC TAC AGG CAG CAC TCT CCA GAC ACC AGG CAG TAC CCT CTG TCA GAC 3904
 Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro Asp Tyr Arg Gln Tyr Pro Leu Ser Asp 1014
 TAC AGG CAG CCA CAG GAT TTT GAT TAT TTC ACT GTG GAC ATG GAG AAA GCA 3955
 Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp Tyr Phe Thr Val Asp Met Glu Lys Gly 1031
 GCC AAA GGA TTT GGA TTC AGC ATT CGT GGA GGA AGG GAA TAC AAG ATG GAT 4006
 Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile Arg Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp 1048
 CTG TAT GTG TTG AGA TTG GCA GAG GAT GGG CCA GCC ATA AGG AAC GGC AGG 4057

【図6】

Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg 1065
 ATG AGG GTA GGA GAT CAG ATC ATT GAA ATA AAT GGG GAA AGC ACA CGA GAC 4108
 Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp 1082
 ATG ACC CAC GCC AGA GCA ATA GAA CTC ATC AAG TCT GGA GGA AGA AGA GTG 4159
 Met Thr His Ala Arg Ala Ile Glu Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val 1099
 CGG CTG CTG CTG AAG AGA GGC ACC GGG CAG GTC CCG GAG TAT GGA ATG GTA 4210
 Arg Leu Leu Leu Lys Arg Gly Thr Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val 1116
 CCT TCC AGC CTC TCC ATG TGC ATG AAA AGT GAC AAG CAT GGG TCC CCA TAT 4261
 Pro Ser Ser Leu Ser Met Cys Met Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr 1133
 TTC TAC TTA CTG GGC CAC CCT AAA GAC ACG ACG AAC CCC ACG CCT GGA GTG 4312
 Phe Tyr Leu Leu Gly His Pro Lys Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val 1150
 CTG CCG CTG CCG CCG CCC CAG GCC TGC CCG AAG TAGGCGTCTCCCTCGAACAGATC 4368
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Gln Ala Cys Arg Lys 1161
 CTCTCTCCATTCTCTCCATCACATCCAGCCCCACCCCTCCGACCCTCCCACCAAGATAGGC 4428
 CCAGACCCAACTTGGGATATCAAAGGGAACACGACGTTAGGAAACCAAAGGAGCTTCG 4488
 GCCGGCGGCCAGAACAGCAGCGCTGGGGAGCAGAGGGAGCGCTGGCGAGCCCGAG 4548
 CGCAGTGCAGGGCCCAGGCTGGAGGAGGTGCCCGGCCAGGGCGGCCAGGGCCGG 4608
 AGGCCCGCCTCGGAGGCGGCCAGGGAAAGGAGGCCTGCGCGCCGGCGTGA 4668
 GGGGCCGCGGCCGCGGCCAGGGCAAGGTGGGTGTGCGCTCGGGGGCCCACCC 4728
 GCAGCGCGCCCACGGGGGGCGCCAGCGCAAGGGAGCATGGCGCCGGGGCCCTGG 4788
 AACGTGCCGGCTCCACAAGCTGCCGGCGCCCTGCAGCCTGGCGCTCGGCCGG 4848
 AGATGACCCCCAAGGCAGGGGCCCCGGCCCTCCACGCAGGCCATCTTCTGGCTT 4908
 CCGTCTACGGCGTTTAATTATTCACACTGTACACGCATAGATCTACCGAGGC 4968
 GAAGCCCCGGAGCGCCGGCGTGCAGCGCGTAGGCCACGGCACGGTGTGGCGCAGG 5028
 CAGACCTAAACTGATCTAAAGCCCCGGTCCATGGTGGGAGCTTGGCACCTACGGAA 5088
 GAACCAAAATCACGCAAACATCACAGAGAGACAGTGCAGTGTAGCTTAGATTCA 5148
 AAAAAAAA 5156

【図7】

TCGCCGCCACGACGCCAGCACCTCCGAGCGACTGACCGACCTCCACGCCGTCCC	60
ACACACTGCCACCGCCGCCGCCGCCGCGCTCGGCCGCACCTCCCTGCCACGTACC	120
ACGTGCCCTGCCGCCAACGCCCTCCGGCCGTTCCGGCTCTGATGCCAGGAAATACA	180
GGCGAGCTCCGGGAAGATCCCCTCTGAGGCTCCGCCCCGGACAGGGCCCCGCCACC	240
TCA TAGCTTTCTCAGCCGCCCCCTCCTCCTCTGGCTCAACTAGGTCAAGCGCAA	300
GGT GATCCGGAGAGCGGGGGCGCGGGGACCGCTCCTCCTGTTACTTATCGAGCGCGC	360
TCCCTCCCGAGCCTCACACCCTCGCTTCGCCCTTTTTCCACTCTCCAGGAACGGTT	420
CCCTCCTCCTCTCCACCTGCCCTACCTTCTCCAGAGATCCGACGTGGCGATTAGAGTT	480
CTCAGCGTCACACTGACTTAGGCAACTAGCCTAGACTGGAGCTGCCTGTTGGAAAC	540
CCCGCGGCAGTAGTGAGCATCAGGCTCTTACCTTGAGGTGGACGGGTGAGAAGAATAG	600
AGGAAGAAGGGATAACTCAGAGGAGGGCCTGAACAACTAGCCCCTCTATTGGCCTGCTT	660
GGGTGAGCATTCACTGAGTGTGTTAAAAAAAACGGAGGGAAAACAAAAGACCTCAG	720
GAGCAGTTGTGCTGCTGGCTCAAGAAGAAAATTCTAGACATTATGCCGGC	780
AAGACCAAAGCTCAGCTAAGACTACTTCTCCAAGAAGATAATTGTATCAGAGGATGGGT	840
TGGATCAGTACAGGTGGTTGAGGAGACGCTGACAGAGGACCATGGAAAGTGGAGAGG	900
ACGCGCGGCTCCTGGCTTCTGAGCTCAGCTCCAGGCACCACAAGGCCACATAAGGA	960
GGGTGAGGTCCCTGGAGTGGACTACATTTCTAACCCTGAGGAGTT ATG GAA TTG GAG	1021
Met Glu Leu Glu	4
AAA AGT GGT GCT CTC CTA GAA AGC GGG ACC TAT GAA GAC AAC TAC TAC GGT	1072
Lys Ser Gly Ala Leu Leu Glu Ser Gly Thr Tyr Glu Asp Asn Tyr Tyr Gly	21
ACC CCG AAG CCT CCA GCT GAA CCA GCA CCA TTA TTA AAT GTA ACA GAC CAG	1123
Thr Pro Ile Pro Pro Ala Glu Pro Ala Pro Leu Leu Asn Val Thr Asp Gln	38
ATA CTT CCG GGA GCT ACT CCA AGT GCT GAG GGG AAG CGG AAA AGA AAT AAG	1174
Ile Leu Pro Gly Ala Thr Pro Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Arg Asn Lys	55
TCA GTG ACC AAC ATG GAG AAA GCA AGT ATA GAG CCT CCA GAG GAG GAA GAA	1225
Ser Val Thr Asn Met Glu Lys Ala Ser Ile Glu Pro Pro Glu Glu Glu	72
GAA GAA AGG CCT GTC AAT GGA AAC GGC GTG GTC ATA ACC CCA GAA TCC	1276

【図8】

Glu Glu Arg Pro Val Val Asn Gly Asn Gly Val Val Ile Thr Pro Glu Ser	89
AGT GAA CAT GAA GAC AAA ACT GCA GGT GCC TCA GGG GAG ACA CCC TCC CAG	1327
Ser Glu His Glu Asp Lys Ser Ala Gly Ala Ser Gly Glu Thr Pro Ser Gln	106
CCT TAC CCT GCA CCC GTG TAC ACC CAG CCC GAA GAG CTC AAG GAC CAG ATG	1378
Pro Tyr Pro Ala Pro Val Tyr Ser Gln Pro Glu Glu Leu Lys Asp Gln Met	123
GAC GAT ACA AAG CCA ACA AAG CCT GAG GAG AAC GAG GAC TCT GAT CCA TTG	1429
Asp Asp Thr Lys Pro Thr Lys Pro Glu Glu Asn Glu Asp Ser Asp Pro Leu	140
CCT GAT AAC TGG GAA ATG GCC TAC ACA GAG AAG GGG GAA GTC TAC TTC ATT	1480
Pro Asp Asn Trp Glu Met Ala Tyr Thr Glu Lys Gly Glu Val Tyr Phe Ile	157
GAC CAT AAC ACA AAG ACA ACA TCA TGG CTG GAT CCG CGA CTT GCG AAA AAG	1531
Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys	174
GCT AAA CCT CCA GAA GAG TGC AAA GAA AAT GAG CTT CCA TAT GGC TGG GAA	1582
Ala Lys Pro Pro Glu Glu Cys Lys Gla Asn Glu Leu Pro Tyr Gly Trp Glu	191
AAA ATC GAT GAT CCT ATA TAT GGC ACT TAC TAT GTT GAC CAC ATA AAT AGA	1633
Lys Ile Asp Asp Pro Ile Tyr Gly Thr Tyr Tyr Val Asp His Ile Asn Arg	208
AGA ACA CAG TTT GAA AAC CCT GTC CTG GAA GCA AAA AGG AAG CTA CAG CAA	1684
Arg Thr Gln Phe Glu Asn Pro Val Leu Glu Ala Lys arg Lys Leu Gln Gln	225
CAT AAC ATG CCC CAC ACA GAA CTT GGA GCA AAG CCC CTG CAG GCC CCA GGT	1735
His Asn Met Pro His Thr Glu Leu Gly Ala Lys Pro Leu Gln Ala Pro Gly	242
TTC CGA GAA AAG CCA CTC TTC ACC CGG GAT GCA TCC CAG TTG AAG GGA ACG	1786
Phe Arg Glu Lys Pro Leu Phe Thr Arg Asp Ala Ser Gln Leu Lys Gly Thr	259
TTC CTC AGC ACC ACC CTC AAA AAG AGC AAC ATG GGC TTT GGG TTT ACC ATA	1837
Phe Leu Ser Thr Thr Leu Lys Ser Asn Met Gly Phe Gly Phe Thr Ile	276
ATT GGT GGA GAC GAG CCG GAT GAG TTT CTA CAG GTG AAA AGT GTG ATC CCG	1888
Ile Gly Gly Asp Glu Pro Asp Glu Phe Leu Gln Val Lys Ser Val Ile Pro	293
GAT GGG CCT GCC GCA CAG GAT GGG AAA ATG GAG ACA GGT GAT GTC ATT GTC	1939
Asp Gly Pro Ala Ala Gln Asp Gly Lys Met Glu Thr Gly Asp Val Ile Val	310
TAT ATT AAT GAA GTT TGT GTC CTT GGA CAC ACT CAT GCA GAT GTT GTC AAA	1990

【図9】

Tyr Ile Asn Glu Val Cys Val Leu Gly His Thr His Ala Asp Val Val Lys 327
 CTT TTC CAG TCT GTT CCT ATT GGT CAG AGT GTC AAC TTG GTG TTG TGT CGT 2041
 Leu Phe Gln Ser Val Pro Ile Gly Gln Ser Val Asn Leu Val Leu Cys Arg 344
 GGC TAC CCT TTG CCC TTT GAC CCT GAA GAT CCT GCT AAC AGC ATG GTG CCA 2092
 Gly Tyr Pro Leu Pro Phe Asp Pro Glu Asp Pro Ala Asn Ser Met Val Pro 361
 CCC CTT GCA ATA ATG GAG AGG CCA CCT CCG GTG ATG GTC AAT GGA AGA CAT 2143
 Pro Leu Ala Ile Met Glu Arg Pro Pro Pro Val Met Val Asn Gly Arg His 378
 AAC TAT GAA ACA TAC TTG GAA TAC ATT TCT CGG ACC TCA CAG TCG GTC CCA 2194
 Asn Tyr Glu Thr Tyr Leu Glu Tyr Ile Ser Arg Thr Ser Gln Ser Val Pro 395
 GAT ATT ACA GAC CGG CCA CCT CAT TCT TTG CAC TCC ATG CCA GCT GAC GGC 2245
 Asp Ile Thr Asp Arg Pro Pro His Ser Leu His Ser Met Pro Ala Asp Gly 412
 CAG CTA GAT GGC ACG TAT CCA CCA CCC GTC CAT GAC GAC AAT GTG TCT ATG 2296
 Gin Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Pro Val His Asp Asp Asn Val Ser Met 429
 GCT TCG TCT GGA GCC ACT CAA GCT GAA CTT ATG ACC TTA ACC ATT GTG AAA 2347
 Ala Ser Ser Gly Ala Thr Gln Ala Glu Leu Met Thr Leu Thr Ile Val Lys 446
 GGT GCC CAG GGA TTT GGC TTT ACT ATT GCC GAC AGT CCC ACG GGA CAG CGG 2398
 Gly Ala Gln Gly Phe Gly Phe Thr Ile Ala Asp Ser Pro Thr Gly Gln Arg 463
 GTG AAA CAA ATC CTT GAC ATT CAG GGA TGC CCT GGG CTG TGT GAA GGA GAC 2449
 Val Lys Gln Ile Leu Asp Ile Gln Gly Cys Pro Gly Leu Cys Glu Gly Asp 480
 CTC ATT GTT GAG ATC AAC CAA CAG AAT GTA CAG AAC CTG AGC CAT ACA GAA 2500
 Leu Ile Val Glu Ile Asn Gln Gln Asn Val Gln Asn Leu Ser His Thr Glu 497
 GTA GTG GAT ATA CTT AAG GAC TGC CCC GTT GGA AGT GAG ACT TCT TTA ATC 2551
 Val Val Asp Ile Leu Lys Asp Cys Pro Val Gly Ser Glu Thr Ser Leu Ile 514
 ATC CAT CGA GGA GGT TTC TTT TCT CCA TGG AAA ACT CCA AAG CCT ATG ATG 2602
 Ile His Arg Gly Gly Phe Phe Ser Pro Trp Lys Thr Pro Lys Pro Met Met 531
 GAC CGA TGG GAG AAC CAA GGC AGT CCA CAA ACA AGT TTA TCT GCT CCG GCC 2653
 Asp Arg Trp Glu Asn Gln Gly Ser Pro Gln Thr Ser Leu Ser Ala Pro Ala 548
 GTC CCA CAG AAC CTG CCC TTC CCA CCT GCC CTT CAC AGG AGC TCC TTT CCT 2704

【図10】

Val Pro Gln Asn Leu Pro Phe Pro Pro Ala Leu His Arg Ser Ser Phe Pro 565
 GAT TCA ACA GAG GCC TTT GAC CCA CGG AAG CCT GAC CCA TAT GAG CTC TAC 2755
 Asp Ser Thr Glu Ala Phe Asp Pro Arg Lys Pro Asp Pro Tyr Glu Leu Tyr 582
 GAG AAA TCG AGA GCC ATT TAT GAA AGT AGG CAA CAA GTG CCA CCC AGG ACC 2806
 Glu Lys Ser Arg Ala Ile Tyr Glu Ser Arg Gln Gln Val Pro Pro Arg Thr 599
 AGT TTT CGA ATG GAT TCC TCT GGT CCA GAT TAT AAG GAA CTG GAT GTT CAC 2857
 Ser Phe Arg Met Asp Ser Ser Gly Pro Asp Tyr Lys Glu Leu Asp Val His 616
 CTT CGG AGG ATG GAG TCT GGA TTT GCC TTT AGA ATC CTT GGG GGA GAT GAA 2908
 Leu Arg Arg Met Glu Ser Gly Phe Phe Arg Ile Leu Gly Gly Asp Glu 633
 CCT GGA CAG CCT ATT TTG ATC GGA GCC GTC ATT GCC ATG GGC TCA GCT GAC 2959
 Pro Gly Gln Pro Ile Leu Ile Gly Ala Val Ile Ala Met Gly Ser Ala Asp 650
 AGA GAC GGC CGT CTA CAC CCA GGA GAT GAG CTT GTC TAT GTC GAT GGG ATC 3010
 Arg Asp Gly Arg Leu His Pro Gly Asp Glu Leu Val Tyr Val Asp Gly Ile 667
 CCA GTG GCT GGC AAG ACC CAC CGC TAT GTC ATC GAC CTC ATG CAC CAC GCG 3061
 Pro Val Ala Gly Lys Thr His Arg Tyr Val Ile Asp Leu Met His His Ala 684
 GCC CGC AAT GGG CAG GTT AAC CTC ACT GTG AGA AGA AAG GTG CTA TGT GGA 3112
 Ala Arg Asn Gly Gln Val Asn Leu Thr Val Arg Arg Lys Val Leu Cys Gly 701
 GGG GAG CCC TGC CCA GAG AAT GGG AGG AGT CCA GGC TCT GTA TCA ACT CAC 3163
 Gly Glu Pro Cys Pro Glu Asn Gly Arg Ser Pro Gly Ser Val Ser Thr His 718
 CAC AGC TCT CCG CGC AGT GAC TAT GCC ACC TAC TCC AAC AGC AAC CAC GCC 3214
 His Ser Ser Pro Arg Ser Asp Tyr Ala Thr Tyr Ser Asn Ser Asn His Ala 735
 GCC CCC AGC AGC AAT GCC TCA CCT CCT GAA GGC TTT GCC TCA CAC AGC TTG 3265
 Ala Pro Ser Ser Asn Ala Ser Pro Pro Glu Gly Phe Ala Ser His Ser Leu 752
 CAG ACC AGT GAT GTG GTC ATT CAC CGC AAA GAA AAC GAA GGG TTT GCC TTC 3316
 Gln Thr Ser Asp Val Val Ile His Arg Lys Glu Asn Glu Gly Phe Gly Phe 769
 GTC ATC ATC AGC TCT CTG AAC AGG CCT GAG TCT GGA GCC ACC ATA ACT GTG 3367
 Val Ile Ile Ser Ser Leu Asn Arg Pro Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Val 786
 CCC CAT AAA ATT GGA CGA ATC ATT GAT GGG AGC CCT GCA GAT CGC TGT GCC 3418

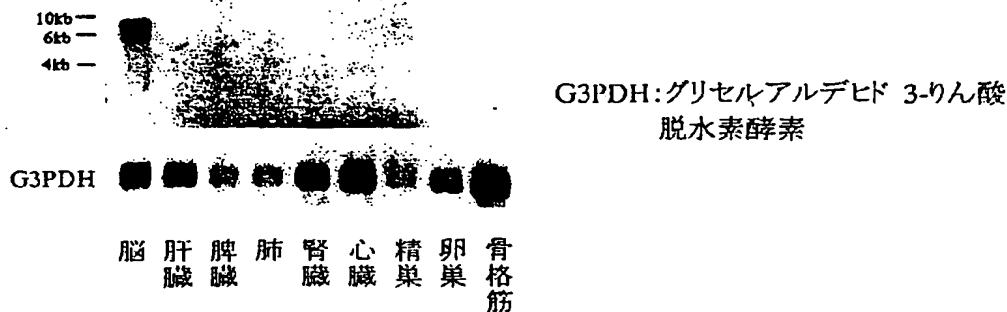
【図11】

Pro His Lys Ile Gly Arg Ile Ile Asp Gly Ser Pro Ala Asp Arg Cys Ala 803
 AAA CTC AAA GTG GGC GAC CGT ATC TTA GCA GTC AAC GGC CAG TCT ATC ATC 3469
 Lys Leu Lys Val Gly Asp Arg Ile Leu Ala Val Asn Gly Gln Ser Ile Ile 820
 AAC ATG CCT CAC GCT GAC ATT GTG AAG CTC ATC AAG GAC CCC GGT CTC AGT 3520
 Asn Met Pro His Ala Asp Ile Val Lys Leu Ile Lys Asp Ala Gly Leu Ser 837
 GTC ACC CTT CGC ATC ATT CCT CAG GAG GAG CTC AAC AGC CCA ACA TCA GCA 3571
 Val Thr Leu Arg Ile Ile Pro Gln Glu Glu Leu Asn Ser Pro Thr Ser Ala 854
 CCC AGT TCA GAG AAA CAG AGC CCC ATG GCC CAG CAC AGC CCT CTG GCC 3622
 Pro Ser Ser Glu Lys Gln Ser Pro Met Ala Gln Gln His Ser Pro Leu Ala 871
 CAG CAG AGT CCT CTG GCC CAG CCA AGC CCC GCC ACC CCC AAC AGC CCA GTC 3673
 Gln Gln Ser Pro Leu Ala Gln Pro Ser Pro Ala Thr Pro Asn Ser Pro Val 888
 GCA CAG CCA GCT CCT CCC CAA CCT CTC CAG CTG CAA GGA CAC GAA AAT AGT 3724
 Ala Gln Pro Ala Pro Pro Gln Pro Leu Gln Leu Gln Gly His Glu Asn Ser 905
 TAC AGG TCA GAA GTT AAA GCG AGG CAA GAT GTG AAG CCA GAC ATC CGG CAG 3775
 Tyr Arg Ser Glu Val Lys Ala Arg Gln Asp Val Lys Pro Asp Ile Arg Gln 922
 CCT CCC TTC ACA GAC TAC AGG CAG CCC CCG CTG GAC TAC AGG CAG CCC CCG 3826
 Pro Pro Phe Thr Asp Tyr Arg Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln Pro Pro 939
 GGA GGA GAC TAC TCA CAG CCC CCA CCC TTG GAC TAC AGG CAG CAC TCT CCA 3877
 Gly Gly Asp Tyr Ser Gln Pro Pro Leu Asp Tyr Arg Gln His Ser Pro 956
 GAC ACC AGG CAG TAC CCT CTG TCA GAC TAC AGG CAG CCA CAG GAT TTT GAT 3928
 Asp Tyr Arg Gln Tyr Pro Leu Ser Asp Tyr Arg Gln Pro Gln Asp Phe Asp 973
 TAT TTC ACT GTG GAC ATG GAG AAA GGA GCC AAA GGA TTT GGA TTC AGC ATT 3979
 Tyr Phe Thr Val Asp Met Glu Lys Gly Ala Lys Gly Phe Gly Phe Ser Ile 990
 CGT GGA GGA AGG GAA TAC AAG ATG GAT CTG TAT GTG TTG AGA TTG GCA GAG 4030
 Arg Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Met Asp Leu Tyr Val Leu Arg Leu Ala Glu 1007
 GAT GGG CCA GCC ATA AGG AAC GGC AGG ATG AGG GTA GGA GAT CAG ATC ATT 4081
 Asp Gly Pro Ala Ile Arg Asn Gly Arg Met Arg Val Gly Asp Gln Ile Ile 1024
 GAA ATA AAT GGG GAA ACC ACA CGA GAC ATG ACC CAC GCC AGA GCA ATA GAA 4132

【図12】

Glu Ile Asn Gly Glu Ser Thr Arg Asp Met Thr His Ala Arg Ala Ile Glu 1041
 CTC ATC AAG TCT CGA GGA AGA AGA GTG CGG CTG CTG CTG AAG AGA GGC ACG 4183
 Leu Ile Lys Ser Gly Gly Arg Arg Val Arg Leu Leu Leu Lys Arg Gly Thr 1058
 GGG CAG GTC CCG GAG TAT GGA ATG GTA CCT TCC AGC CTC TCC ATG TGC ATG 4234
 Gly Gln Val Pro Glu Tyr Gly Met Val Pro Ser Ser Leu Ser Met Cys Met 1075
 AAA AGT GAC AAG CAT GGG TCC CCA TAT TTC TAC TTA CTG GGC CAC CCT AAA 4285
 Lys Ser Asp Lys His Gly Ser Pro Tyr Phe Tyr Leu Leu Gly His Pro Lys 1092
 GAC ACG ACG AAC CCC ACG CCT GGA GTG CTG CCG CTG CCG CCC CAG GCC 4336
 Asp Thr Thr Asn Pro Thr Pro Gly Val Leu Pro Leu Pro Pro Pro Gln Ala 1109
 TGC CGG AAG TAGGCGTCTCCCTCGAACGACATCCTCTCCATTCTCCATCACATCCAGCCCC 4400
 Cys Arg Lys 1112
 ACCCTCCGACCCCTCCACCAGATAGGCCAGACCCAATGGGATATCAAAGGGAAACA 4460
 CGACGTAGGAAACCAAGGAGCTTCGGCCGGCGGCCAGAAGAAGCAGGCCCTGGGGGA 4520
 GCAGAGGGAGCGCTCGGCAGGCCGAGCGCAGTGGCGGCCAGGCTGGAGGGAGGTGCC 4580
 CGGCCGCCAGGGCGGCCGAGGCCGAGGCCGCCCTGGAGGCCGCCAGGGGAAGGA 4640
 GGCCTGCGCGGCCGGCGTAGGGCCTGGGGCGCGGCCAGGCGGCCAGGCCAA 4700
 CCTGGGTGTGCGCTCGGGGCCGACCCGAGCGCGCCCACGGGGCGGCCAGCGCG 4760
 CAAGGCCACGATGGCGCCGGGCCCTGGAAGGTGCCGGCTCCGACAAGCTGCCGGCGC 4820
 CCTGCAGCCTGGCGCCTCGGCCGCCAGATGAGCCCCAAGGCCAGGGGCCAGCGCG 4880
 CCTCCACGCAGGCCGATCTTCTGGTTCCGTCTCACGGCTTTAATTATTCACGT 4940
 TCACACCGATAGATCTATACGAGGCCGAAGGCCGGAGGCCGGCTGCCACGCCGT 5000
 AGGCCGCACGGCACGGTAGGGTGCGCCAGGCAGACTAACTGATCCTAAAGCCCCGGTTC 5060
 CATGGTGGGAGCTTGGCAGCTACGGAAAGAACCAAAATCACGCAAACATCACAGAGAGAC 5120
 AGTGCAGTGTAGCTTAGATTCAAAAAAAAAAAAAA 5156

【図13】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】特に脳で発現し、P D Z ドメインを持つ、とりわけアクチビン受容体に親和性を有する蛋白質、および該蛋白質に対する結合能を有する結合蛋白質の機能解明、またはアクチビン受容体に親和性を有する物質の神経系での細胞分化阻害及び神経栄養因子様活性の詳細な機構等を解明する手段として、新規な該蛋白質の単離法ならびに検出法、該新規蛋白質遺伝子を含むDNA、該新規蛋白質遺伝子がコードする蛋白質の製造法、および該DNAならびに該蛋白質の用途を提供する。

【解決手段】本発明の蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは、①本発明の蛋白質に対する結合蛋白質の決定、②抗体および血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④発現系を用いた結合アッセイ系およびtwo-hybrid法を用いたアッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較に基づいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成等における試薬として用いることができ、また、⑦遺伝子治療等の薬物として用いることができる。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100073955
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社大阪工場内
朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社 大阪工場内
内山 務

出願人履歴情報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名 武田薬品工業株式会社